

5

El islote pancreático en el desarrollo y tratamiento de la diabetes

COORDINADOR

Eduard Montanya



EDITORIAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE DIABETES

El Islote Pancreático en el Desarrollo y Tratamiento de la Diabetes

COORDINADOR
Eduard Montanya



MIEMBROS DEL GRUPO DE TRABAJO ISLOTES PANCREATICOS DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE DIABETES.

Dr. Manuel Aguilar Diosdado

Jefe de Servicio, Hospital Puerta del Mar, Cádiz

Dr. Albert Barberà Lluís

Laboratorio de Diabetes y Obesidad Experimentales.
Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i
Sunyer, Barcelona

Dr. Francisco José Bedoya Bergua

Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina
Regenerativa (CABIMER), Universidad Pablo de
Olavide de Sevilla

Dr. Enrique Blázquez Fernández

Catedrático y jefe de Servicio departamento de bioquímica y biología molecular, facultad de Medicina Universidad Complutense.

Dr. Jesús Cancelas Navias

Dpto. Metabolismo, Nutrición y Hormonas.
Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

Dr. Luís Castaño González

Hospital de Cruces- Bilbao

Dra. María Gasa Amaldich

Laboratorio de Diabetes y Obesidad Experimentales.
Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i
Sunyer, Barcelona

Dr. Fernando Gómez Peralta,

Adjunto Hospital Clínico Universitario de Salamanca

Dr. Ramón Gomis Barberà

Hospital Clinic i Provincial. Barcelona

Dr. Antonino Jara Albarrán

Jefe de Servicio Hospital Gregorio Marañón

Dra. Judith López Fernández

Adjunto Hospital Universitario de Canarias

Dr. Franz Martin Bermudo

Investigación, CABIMER, Sevilla

Dr. Eduard Montanya Mias

Jefe de Sección. Servicio de Endocrinología.

Hospital Universitari de Bellvitge.

Profesor Asociado. Departamento de Ciencias
Clínicas. Facultad de Medicina Universidad de
Barcelona.

Dr. Ángel Nadal Navajas

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel
Hernández, Elche.

Dra. Anna Novials Sardà

Endocrinóloga. Directora Fundació Sardà Farriol

Dr. Ivan Quesada Moll

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel
Hernández, Elche.

Dra. M^a José Redondo Velasco

Clínica Universitaria de Navarra

Dr. Enrique Roche Collado

Profesor Titular de Universidad.
Departamento de Biología Aplicada, Área de
Nutrición Universidad Miguel Hernández. Alicante

Dra. Petra Sánchez García Cervigón

Hospital Gregorio Marañón

Dr. Bernat Soria Escoms

Centro andaluz de Biología Molecular y Medicina
Regenerativa, Universidad Pablo Olavide, Sevilla

Dr. Juan R. Tejedo Huamán

Investigación, CABIMER, Sevilla

Dra. Isabel Valverde Alonso

Consultora, FJD, Departamento de Metabolismo,
Nutrición y Hormonas, Madrid

Dra. María Luisa Villanueva-Peñacarrillo

Dpto. Metabolismo, Nutrición y Hormonas.
Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

Dra. Marta Vives-Pi

Servei d'Endocrinologia
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol
Badalona. Barcelona



SOCIEDAD ESPAÑOLA DE DIABETES.

JUNTA DIRECTIVA

PRESIDENTE. Dr. Ramon Gomis de Barbará

Hospital Clínic i Provincial. Barcelona

VICEPRESIDENTE 1º. Dr. Luís Castaño González

Hospital de Cruces. Bilbao

VICEPRESIDENTA 2ª. Dra. Adela Rovira Loscos

Fundación Jiménez Díaz. Madrid

SECRETARIA. Dra. Lucrecia Herranz de la Morena

Hospital La Paz. Madrid

VICESECRETARIO. Dr. Juan Emilio Feliu Albiñana

Institut de Recerca. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona

TESORERO. Dr. José Manuel Fernández-Real Lemos

Hospital Joseph Trueta. Girona

VOCAL 1º. Dra. Sara Artola Menéndez

Centro de Salud Loranca. Fuenlabrada (Madrid)

VOCAL 2ª. Dra. Ana Chico Ballesteros

Hospital Cruz Roja Dos de Maig. Barcelona

VOCAL 3º. Dr. Alberto Moreno Carazo

Centro Hospitalario de Jaén

VOCAL 4ª. Dr. Joseph Franch Nadal

ABS Raval Sud-ICS Drassanes. Barcelona

VOCAL 5º Dr. Alfonso López Alba

Hospital Universitario de Canarias. Tenerife



ÍNDICE DE AUTORES

Quesada Moll I

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Elche.

Tudurí López E

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Elche.

Nadal Navajas, A

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Elche.

Vives-Pi M

Lucas Martín A

Servei d'Endocrinologia
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol
Badalona. Barcelona

Planas Bas R

Laboratori d'Immunobiologia per a la Recerca i les Aplicacions Diagnostiques (LIRAD). Banc de Sang i Teixits (BST). Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol

Roche Collado E

Profesor Titular de Universidad.
Departamento de Biología Aplicada, Área de Nutrición Universidad Miguel Hernández. Alicante

Bedoya Verruga FJ

Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Universidad Pablo de Olavide de Sevilla

Tejedo Huamán JR

Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Universidad Pablo de Olavide de Sevilla

Cahuana G

Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER), Universidad Pablo de Olavide de Sevilla

Novials Sardà A

Endocrinóloga. Directora Fundació Sardà Farriol

Casas Fontdevila S

Investigadora básica. Fundació Sardà Farriol

Cancelas Navias A

Dpto. Metabolismo, Nutrición y Hormonas.
Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

Sancho Bómez V

Dpto. Metabolismo, Nutrición y Hormonas.
Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

Valverde Alonso I

Dpto. Metabolismo, Nutrición y Hormonas.
Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

Villanueva-Peñacarrillo ML

Dpto. Metabolismo, Nutrición y Hormonas.
Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

Montanya Mias E

Jefe de Sección. Servicio de Endocrinología.
Hospital Universitari de Bellvitge.
Profesor Asociado. Departamento de Ciencias Clínicas. Facultad de Medicina Universidad de Barcelona.

Nacher García M

Facultativo Especialista. Servicio de Endocrinología. Hospital Universitari de Bellvitge.

Téllez Besolí N

Investigador, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Servicio de Endocrinología, Hospital Universitari de Bellvitge.

Barberà Lluís A

Laboratorio de Diabetes y Obesidad Experimentales.
Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona

Gasa Amaldich RM

Laboratorio de Diabetes y Obesidad Experimentales.
Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona

Martín Bermudo F

Centro andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa, Universidad Pablo Olavide, Sevilla

Vaca Sánchez P

Centro andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa, Universidad Pablo Olavide, Sevilla

Soria Escoms B

Centro andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa, Universidad Pablo Olavide, Sevilla



ÍNDICE DE CAPÍTULO

- 14 **Introducción.**
Eduard Montanya
- 18 **CAPÍTULO 1**
Regulación por la glucosa de la función de las células alfa, beta y delta del islote de Langerhans.
Ivan Quesada, Eva Tudurí, Angel Nadal
- 34 **CAPÍTULO 2**
Autoinmunidad frente a los islotes en pacientes con diabetes mellitus tipo 1
M Vives-Pi, A Lucas, R. Planas
- 50 **CAPÍTULO 3**
Glucolipotoxicidad en la célula beta y su relación con la diabetes tipo 2
Enrique Roche Collado
- 66 **CAPÍTULO 4**
Lesión y supervivencia de las células beta pancreáticas
Francisco Bedoya, Juan Tejedo, Gladys Cahuana
- 78 **CAPÍTULO 5**
Amilina y toxicidad beta pancreática
Anna Novials Sardà
- 92 **CAPÍTULO 6**
Las incretinas en la secreción de insula
Jesús Cancelas, Verónica Sancho, Isabel Valverde, María Luisa Villanueva-Peñalcarrillo.
- 108 **CAPÍTULO 7**
Terapia celular en diabetes: trasplante de islotes
Eduard Montanya, Montserrat Nàcher, Noelia Téllez.
- 124 **CAPÍTULO 8**
Desarrollo embrionario del páncreas y regeneración en el páncreas adulto
Albert Barberà, Rosa Gasa
- 140 **CAPÍTULO 9**
Células Troncales en el tratamiento de la diabetes
Franz Martin, Pilar Vaca, Bernat Soria

Edita: Sociedad Española de Diabetes



Diseño, realización y producción:



Orfila, 5. 28010 Madrid

© 2007 Sociedad Española de Diabetes (SED)

Don Ramón de la Cruz, 88 28006 Madrid

Impresión: Gráficas Monterreina

Impreso en España- Printed in Spain

Depósito Legal:

ISBN: 978-84-691-0089-9

Todos los derechos reservados. Prohibido reproducir ninguna parte de esta publicación, ni transmitirla a ningún medio electrónico, mecánico, fotocopiarlo, en discos, ni de cualquier otra forma, sin la previa autorización escrita del copyright.

Responsabilidad de productos: el editor no puede garantizar los datos sobre posología y aplicaciones de los productos indicados en este libro. En cada uno de los casos, el usuario tiene que comprobar su precisión consultando otra literatura farmacéutica.

www.sediabetes.org

Introducción

AUTOR

Eduard Montanya

Jefe de Sección. Servicio de Endocrinología.
Hospital Universitari de Bellvitge.
Profesor Asociado. Departamento de Ciencias Clínicas. Facultad de
Medicina Universidad de Barcelona.

Introducción

La edición de este nuevo libro de la colección de monografías de la Sociedad Española de Diabetes es una oportunidad para hacer una breve presentación del Grupo de Islotes Pancreáticos. El Grupo de Islotes está integrado por investigadores cuyas líneas de trabajo están centradas en el estudio de la biología celular y molecular del islote pancreático desde perspectivas diversas. A partir del nexo común que significa el interés por el islote pancreático, el grupo incorpora perfiles profesionales y áreas de conocimiento diversas con médicos, biólogos, bioquímicos o farmacéuticos con líneas de investigación básicas, preclínicas y clínicas. Los capítulos de la monografía tienen una relación directa con las líneas de trabajo que los miembros del Grupo de Islotes desarrollan y refleja la diversidad y complementariedad de sus líneas de investigación. En un entorno en el que la interrelación entre investigadores es fundamental, el Grupo de Islotes ofrece un foro de comunicación, intercambio y participación entre profesionales de ámbitos distintos que a menudo es difícil encontrar en otras sociedades o grupos de trabajo.

La monografía que presentamos pretende ofrecer al lector interesado pero no especializado, una visión actual del papel fundamental del islote pancreático en la etiopatogenia y el tratamientos de la diabetes. El capítulo 1 muestra una visión global de la función del islote como órgano endocrino en el que la integración de las respuestas de los distintos tipos celulares del islote conforman su función. El papel fundamental de la destrucción autoinmune del islote en el desarrollo de la diabetes tipo 1, cuyos mecanismos se revisan de forma actualizada en el capítulo 2, está bien establecido desde hace años. Por el contrario, la aceptación del concepto de que la disfunción y pérdida de células beta es también esencial para la aparición de la diabetes tipo 2 es más reciente. En este sentido en el capítulo 3 se discute el papel de la glucotoxicidad en la célula beta en el desarrollo de diabetes tipo 2. Recientemente se ha postulado que aunque con orígenes distintos, los mecanismos de destrucción de las células beta del islotes pueden ser comunes en la diabetes tipo 1 y tipo 2, y estos aspectos, junto con los procesos de supervivencia que se ponen en marcha tras la lesión de la célula beta se discuten en el capítulo 4. Las controversias acerca del papel de la amilina en la etiopatogénesis de la diabetes tipo 2 se analizan en el capítulo 5, que incluye los interesantes hallazgos de mutaciones en el gen de la amilina en

pacientes con diabetes. Las aportaciones de la investigación en islotes al tratamiento de la diabetes se aprecian en el capítulo 6, dedicado al papel de las incretinas en el estímulo de la secreción de insulina, aspecto de gran actualidad por la reciente aprobación de los primeros fármacos basados en la acción de GLP-1 para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Finalmente, la sustitución o la regeneración de las células beta ofrece la apasionante posibilidad de lograr la curación de la diabetes. La situación actual del trasplante celular en la diabetes y en especial del trasplante de islotes se revisa en el capítulo 7, y la posibilidad de generar células productoras de insulina a partir de células madres embrionarias o adultas, para cuyo fin el conocimiento de la embriogénesis del páncreas endocrino aporta una información que puede ser fundamental, se analiza en los capítulos 8 y 9 de la monografía.

Es el deseo de los miembros del Grupo de Islotes que hemos participado en la elaboración de esta monografía que sea de utilidad para facilitar una mejor comprensión del papel central del islote pancreático en el desarrollo de la diabetes, y acerque de una forma rigurosa pero comprensible las implicaciones que para el conocimiento y curación de la diabetes puede aportar la actividad de los miembro del grupo desde los resultados de sus líneas de trabajo.

CAPÍTULO 1

Regulación por glucosa de la función de las células alfa, beta y delta en el islote de Langerhans

AUTORES

Ivan Quesada
Eva Tudurí
Ángel Nadal

Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Elche.

1. Introducción

La regulación de la glucemia por parte del islote depende principalmente de la función individual de las diferentes poblaciones celulares que lo integran y de la interacción entre éstas. La masa de células endocrinas del páncreas apenas constituye un 1% del total del órgano, y se agrupa en poblaciones de 1000-3000 células formando los islotes de langerhans. El tipo celular predominante corresponde a la célula β -pancreática, responsable de la liberación de insulina, mientras que la célula α secretora de glucagón y la δ secretora de somatostatina están representadas en una menor proporción. Si bien en ratón la célula β constituye alrededor del 70-80 % del islote y la célula α en torno al 20 %, estudios recientes en humano han demostrado una presencia mayor de células α (55 % de células β frente a un 40 % de α). Estos trabajos han puesto de manifiesto la especial relevancia de las células secretoras de glucagón en la función del islote humano. En el caso de las células δ secretoras de somatostatina, éstas pueden llegar a constituir el 10 % del total del islote. Otros tipos celulares minoritarios como las células PP productoras del polipéptido pancreático constituyen menos del 1 %. El control de la glucemia por parte del islote se debe mayoritariamente a la acción directa de las células α y β . Mientras que la célula β libera insulina con concentraciones crecientes de glucosa, la secreción de glucagón por parte de la célula α tiene lugar en condiciones hipoglucémicas. La población δ ejerce una función reguladora indirecta a través de mecanismos paracrinós ya que la somatostatina inhibe la secreción de las células α y β . Además de la función y la interacción de estos tipos celulares, la regulación de la glucemia está también sometida a varios niveles de control neuronal y hormonal aunque no vamos a abordarlos en este capítulo.

Casi todos los trabajos científicos han sido dirigidos al estudio de la célula β y la secreción de insulina, de manera que hoy en día se tiene un gran conocimiento de la regulación de este tipo celular. Sin embargo, se sabe muy poco de la fisiología de las poblaciones no- β pese a su importancia en el islote y a su papel en el control de la glucosa. Esta falta de información en los estudios del islote se debe a varios factores; siendo el principal la escasa representación de estos tipos celulares en el islote frente a la presencia dominante de la célula β . Igualmente contribuye el hecho de que debido a la escasa caracterización de estas células hayan faltado patrones de identificación y que las metodologías convencionales presentaban limitaciones técnicas para poder estudiar de forma inequívoca e independiente estas poblaciones en el islote entero. Las innovaciones recientes en múltiples técnicas ha propiciado en

los últimos años la aparición de varios estudios abordando la fisiología de las células α y δ . Una característica especialmente interesante es que varios de estos trabajos se han realizado en el islote intacto. Si bien la información acerca de las células α y δ basándose en líneas celulares o en células aisladas en cultivo resulta relevante, se ha constatado que estos modelos presentan diferencias fisiológicas con respecto a las observaciones realizadas en el islote de Langerhans intacto. De hecho, según han evidenciado algunos trabajos “in vivo”, el islote intacto como modelo de estudio se acerca mucho más al comportamiento fisiológico. Estas diferencias resultan principalmente de la importancia crítica en el funcionamiento del islote del contacto célula-célula y de la regulación autocrina y paracrina. En base a estos motivos, en los últimos años varios grupos de investigación han tratado de caracterizar la fisiología de las células α , β y δ en el islote intacto, o incluso revisar conceptos cuyas conclusiones previas derivaban de estudios procedentes de modelos diferentes. En este capítulo nos centraremos en la descripción de los mecanismos que regulan la función de los tipos celulares α , β y δ , principalmente en base a estudios realizados en el islote intacto. La función individual e interacción de estos tres tipos celulares constituye la principal línea de acción en la regulación de la glucemia.

2. Regulación de la secreción de insulina de la célula β por glucosa.

El esquema de acoplamiento estímulo-secreción en célula β está ampliamente aceptado, si bien algunos datos de este modelo se han revisado tras diversos estudios en islote entero utilizando técnicas electrofisiológicas y de microscopía confocal. La glucosa extracelular entra en el citosol a través de transportadores específicos (tipo GLUT-2), donde se metaboliza a piruvato mediante la glicólisis. El piruvato en la célula β es mayoritariamente metabolizado por vía aeróbica, de manera que entra en la mitocondria, activando el ciclo de Krebs que da lugar a la producción de CO_2 y los nucleótidos NADH y FADH_2 . Estos últimos actúan como fuente de transferencia de electrones en la cadena de reacciones que participan en la fosforilación oxidativa y en la síntesis de ATP.

El incremento en la razón ATP/ADP da lugar al cierre de los canales de K^+ dependientes de ATP (K_{ATP}), lo cual lleva a una despolarización respecto a los valores de potencial de reposo que se sitúan de -60 a -80 mV (ver figura 1A). En ausencia de

glucosa, la conductancia de los canales K_{ATP} es de 4 nS, y con el incremento de la concentración de este azúcar se produce una disminución creciente de esta conductancia con una inhibición media en torno a 5 mM glucosa. La despolarización derivada del cierre de canales K_{ATP} activa canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, permitiendo así la entrada de Ca^{2+} desde el exterior. En condiciones de concentraciones estimuladoras de glucosa, la actividad eléctrica en la célula β sigue un patrón oscilatorio en el islote de manera que se generan oscilaciones del potencial de membrana entre un valor de despolarización, sobre el que se generan potenciales de acción (fase activa), y una fase silente de repolarización del potencial de membrana. Si bien durante los potenciales de acción de la fase activa sólo intervienen corrientes de Ca^{2+} mediadas por canales tipo L en ratón, en humano además participan corrientes de Na^+ dependientes de voltaje.

El incremento de Ca^{2+} citosólico derivado de la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes del potencial de membrana es la señal que desencadena la secreción de insulina. Ante un estímulo de glucosa por encima de 8 mM, se produce una señal de Ca^{2+} oscilatoria que da lugar a una liberación pulsátil de insulina (ver figura 2). A diferencia de lo que ocurre cuando se encuentran aisladas en cultivo, las células β en el islote intacto generan un patrón oscilatorio regular y sincrónico tanto a nivel de la actividad eléctrica como de la señal de Ca^{2+} . En ratón, esta coordinación se debe a la existencia de un alto grado de acoplamiento celular mediado por uniones tipo gap (gap-junctions) que permiten el funcionamiento en forma de sincitio de toda la población β . Este acoplamiento en islotes de ratón se cree que es indispensable para una adecuada liberación de insulina, dando lugar a una secreción más vigorosa. Sin embargo, estudios recientes en islotes humanos indican que el acoplamiento celular y la coordinación de las señales de Ca^{2+} tienen lugar en grupos de células, coincidiendo con su organización espacial, pero no en todo el islote. En el islote de ratón la población β está agrupada en el centro con ramificaciones hacia la superficie, mientras que las células α y δ se disponen en las capas más superficiales. Sin embargo, la organización espacial en el islote humano es mucho más azarosa con grupos celulares ubicados sin un patrón espacial definido. El significado funcional de esta estructuración en el caso del islote humano está aún por resolver.

Además de un efecto directo sobre la secreción de la célula β , la glucosa también ejerce una acción indirecta al estimular la exocitosis de la propia población β y de células vecinas, favoreciendo así la co-secreción junto a las hormonas del islote, de diferentes moléculas que permiten una regulación autocrina y paracrina. En condi-

ciones de hipoglucemia se secreta glucagón, que tiene un efecto positivo sobre la secreción de insulina, posiblemente por incremento de los niveles de AMP cíclico en célula β . En cambio, a concentraciones elevadas de glucosa extracelular se secretan varias moléculas con efecto inhibitorio. Una de ellas es la somatostatina liberada desde las células δ . Aunque el mecanismo de acción no está todavía completamente analizado, parece que implica una disminución de niveles de AMP cíclico. Por otro lado, el ácido γ -aminobutírico (GABA) cosecretado con la insulina regula negativamente y de manera autocrina al unirse a receptores GABAB que se expresan en la célula β . La disminución de la exocitosis tiene lugar por activación de proteínas G inhibitorias. Por último comentar el papel autocrino y paracrino del ATP extracelular que se cosecreta junto a las hormonas del islote desde los gránulos. Estudios recientes utilizando técnicas electrofisiológicas demuestran que el ATP es capaz de reducir la secreción inducida por glucosa actuando a varios niveles pero sobre todo por una interferencia directa con el proceso de exocitosis.

Aunque los mecanismos de control de las células α y δ no están todavía muy definidos, existen importantes paralelismos con respecto a la célula β . Las células α y δ no sólo son eléctricamente excitables sino que además la glucosa regula su actividad eléctrica, y su secreción hormonal es dependiente de Ca^{2+} y de canales dependientes de voltaje.

3. Regulación de la secreción de glucagón de la célula α por glucosa

A pesar de que la regulación de la glucemia en unos determinados límites depende tanto de la insulina como del glucagón en base a perfiles de funcionamiento antagónicos, se sabe muy poco de la regulación de la célula α . El interés por su estudio ha ido creciendo no sólo por una comprensión de la fisiología integral del islote, sino también por razones clínicas. En el caso de pacientes diabéticos se pueden observar niveles de glucagón elevados que, junto a los niveles bajos de insulina, agravan la hiperglucemia. Se puede observar además en estos casos que la inhibición característica de la secreción de glucagón al aumentar la glucemia está alterada, e incluso falla.

Hasta hace poco, los únicos datos acerca del comportamiento de este tipo celular se basaban en estudios de secreción de glucagón. En los últimos años se han desarro-

llado múltiples estudios que abordan su fisiología tanto a nivel celular como molecular. No obstante, aún no se ha llegado a un consenso respecto a los mecanismos que dirigen su funcionamiento ya que son múltiples los niveles de regulación que afectan a la población α , incluyendo un control neural, un importante control paracrino a partir de la secreción de células β y δ vecinas, y también un control directo por parte de la glucosa. Debido a que el efecto paracrino es importante dentro del islote, todavía no se sabe con exactitud si la inhibición en la secreción de glucagón a concentraciones elevadas de glucosa es debida estrictamente al azúcar o a un efecto paracrino de las células vecinas. En cualquier caso, en base a varios estudios realizados principalmente en islote entero, se sabe que la respuesta ante la glucosa de las células α y β es totalmente opuesta en cuanto a la actividad eléctrica, las señales de Ca^{2+} y la liberación hormonal, de manera que las primeras son más activas en bajas concentraciones de glucosa y se inhiben a altas concentraciones, mientras que la población β responde antagónicamente. El grupo de Patrick Rorsman propuso un modelo de funcionamiento para la célula α que reconciliaba los datos aportados por varios laboratorios y explicaba el mecanismo de actuación de la glucosa (ver figura 1B). A continuación detallamos algunas de las características fisiológicas de este tipo celular en base a este modelo, si bien muchos de los trabajos de los últimos dos años empiezan a proponer varios cambios de menor o mayor consideración.

La célula α presenta canales K_{ATP} , al igual que la célula β , y su actividad es la principal responsable del potencial de membrana en este tipo celular. En bajas concentraciones de glucosa, estos canales tienen una baja actividad dando lugar a un potencial de membrana por debajo de -60 mV. A este potencial negativo se genera una actividad eléctrica basada en potenciales de acción mediados por canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo T, los cuales llevan el potencial de membrana a niveles más positivos donde se activan canales de Na^+ y canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L y N. La repolarización tendría lugar mediante la activación de canales de K^+ tipo A. La entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo L y N sería responsable del aumento citosólico de este ión que da lugar a la exocitosis. En cambio, el incremento de la concentración extracelular de glucosa, llevaría a un aumento intracelular de la relación ATP/ADP que daría lugar al bloqueo de los canales K_{ATP} , despolarizando así la membrana hasta valores de potencial para los cuales se inactivan las corrientes dependientes de voltaje mencionadas anteriormente y que sustentan los potenciales de acción. Esto, por tanto, llevaría a la disminución de la actividad eléctrica. La apertura de canales de Ca^{2+} en la fase eléctrica activa a baja concentración de glucosa facilita la entrada de Ca^{2+} extracelular dando lugar a una

señal oscilatoria (figura 2). Este aumento de Ca^{2+} en el citosol favorece la exocitosis de los gránulos de glucagón. Este modelo propone, por tanto, un efecto directo de la glucosa, y un mecanismo de acción donde los canales K_{ATP} tendrían un papel fundamental en acoplar cambios metabólicos a cambios iónicos y señales de Ca^{2+} que controlarían la liberación de glucagón, de manera muy similar a como ocurre en célula β pero generando cambios opuestos.

Sin embargo, varios estudios acerca del metabolismo de la glucosa observan importantes diferencias entre las células α y β que el modelo anteriormente expuesto no recoge. Aunque ambos tipos celulares disponen de transportadores de glucosa diferentes, principalmente GLUT-2 en el caso de las células β y GLUT-1 en el caso de α , se ha demostrado que el transporte de glucosa no es un factor limitante en el metabolismo del azúcar. No obstante, parece que las diferencias tienen lugar a nivel mitocondrial. Se ha observado mediante diversas aproximaciones técnicas que los cambios inducidos por glucosa en la activación del metabolismo aeróbico mitocondrial son mucho menores en las células α . De hecho, algunos estudios bioquímicos en células del islote separadas por cell sorting indican una mayor grado de metabolismo anaeróbico en células α frente a una mayor actividad metabólica mitocondrial en las células β . Esta idea se sustenta además por estudios que indican que la razón lactato deshidrogenasa / glicerol fosfato deshidrogenasa mitocondrial es baja en la población β , lo cual favorecería la oxidación mitocondrial de la glucosa, mientras que esta razón es más elevada en células no- β . Parece por tanto que la célula α presenta un acoplamiento muy bajo entre la glicólisis en el citosol y la síntesis de ATP en la respiración mitocondrial. Estos datos podrían explicar porqué se observan apenas cambios en la relación ATP/ADP en respuesta a la glucosa en células α comparado con la población β . Por tanto, en el modelo anteriormente expuesto por el grupo de Rorsman habría que proponer mecanismos alternativos de regulación del canal K_{ATP} por parte de la glucosa, a parte del incremento en la razón ATP/ADP. Como hemos comentado anteriormente, aparte de un posible efecto directo de la glucosa sobre la célula α , la regulación paracrina juega un papel importante en el islote. La elevación de la concentración de la glucosa tiene un inevitable efecto estimulatorio sobre la exocitosis de células β y δ vecinas. De entre varios mecanismos, uno de los más importantes en la inhibición de la secreción de glucagón es el llevado a cabo por la insulina. Varios estudios coinciden en que la insulina activa canales K_{ATP} en célula α , inhibiendo la actividad eléctrica y la secreción. Algunos trabajos también indican un papel significativo del Zn^{2+} aunque estos datos son aún controvertidos. Los átomos de Zn^{2+} almacenados junto a la insulina en los gránulos

de las células β quedan en forma libre en el medio extracelular una vez que se ha producido la exocitosis. En células α de islotes de rata se observó inhibición sostenida tanto de la actividad eléctrica como de la secreción hormonal en presencia de Zn^{2+} . Este proceso parece estar mediado también por la apertura de canales K_{ATP} . En cambio, estudios realizados en ratón, tanto en células α aisladas como en islotes, concluyeron que el Zn^{2+} no inhibía la secreción de glucagón y que tampoco se producía activación de los canales K_{ATP} . Al margen de estos agentes paracrinicos también se han descrito otros como la somatostatina y el ácido γ -aminobutírico (GABA), con un notable efecto regulador.

El GABA se libera desde los gránulos de secreción durante la exocitosis, difundiendo por los intersticios del islote y activando receptores GABA_A de células α . La activación de estos receptores se encuentra acoplada a la activación de corrientes de entrada de Cl^- . Dependiendo de la concentración de Cl^- intracelular, la apertura de estos canales suprimirá la actividad eléctrica por hiperpolarización o despolarización de la membrana respecto a los valores en los que se generan los potenciales de acción de Ca^{2+} y Na^+ (modelo explicado anteriormente), inhibiéndose en ambos casos la liberación del glucagón.

La somatostatina (SST) tiene un efecto negativo sobre la liberación de glucagón. Esta hormona se produce y secreta en varios órganos además de en las células δ , abundando la forma activa SST-14 en el páncreas, la cual inhibe tanto la secreción de insulina como la de glucagón al interactuar con receptores de membrana específicos. En ratón, el efecto de la somatostatina sobre la célula α se ha estudiado a nivel de la actividad eléctrica, observando que activa canales de K^+ acoplados a proteínas G, induciendo hiperpolarización de la membrana e inhibiendo los potenciales de acción espontáneos que permiten la entrada de Ca^{2+} y la secreción de glucagón. En rata, se ha estudiado el papel de la somatostatina en la célula α a nivel de capacitancia de la membrana, indicando efectos similares sobre la secreción.

También se ha observado una acción inhibitoria por parte de la amilina o polipéptido amiloide pancreático, tanto sobre los niveles basales de glucagón como sobre los niveles alcanzados tras estimulación con L-arginina. Esta hormona peptídica de 37 aminoácidos se cosecreta junto con insulina o somatostatina desde las células β o δ del islote de Langerhans.

Por tanto, la elevación de la glucemia puede ejercer un efecto directo sobre la célula

la α y la secreción de glucagón, y/o puede participar indirectamente al estimular la secreción de células β y δ activando respuestas paracrinas.

4. Regulación de la secreción de somatostatina en la célula δ por glucosa.

La célula δ apenas está caracterizada, mucho menos que en el caso del tipo celular α , y aún es prematuro proponer un modelo de funcionamiento consolidado. Son pocos los estudios realizados a nivel molecular y celular acerca de su fisiología. No obstante, la escasa información existente indica que estas células tienen un comportamiento fisiológico y unos mecanismos de control con grandes paralelismos con la célula β : incrementos en la concentración extracelular de glucosa llevan a un aumento de la actividad eléctrica, la señal de Ca^{2+} y la liberación de somatostatina. La omisión de Ca^{2+} en el medio bloquea la secreción de la hormona, sugiriendo que la liberación de somatostatina es dependiente de Ca^{2+} .

Con los pocos datos existentes se ha propuesto un mecanismo, todavía precario, para explicar la fisiología de la célula δ . En ausencia de glucosa el potencial de membrana se sitúa en torno a -70 mV, posiblemente debido a la actividad de canales K_{ATP} . Estos canales han sido medidos e identificados en la célula δ por técnicas electrofisiológicas, y se ha demostrado que las sulfonilureas que bloquean estos canales, despolarizan la membrana de estas células, aumentan el Ca^{2+} intracelular y la liberación de somatostatina. Por tanto, se propone que estos canales tienen el mismo papel que en célula β , de manera que acoplan los cambios metabólicos inducidos por la glucosa a cambios eléctricos y de la señal de Ca^{2+} . Se cree, por tanto, que el incremento en la glucosa extracelular también aumenta la razón ATP/ADP bloqueando los canales K_{ATP} y generando la despolarización de la membrana. Esto llevaría a un nivel de potencial en torno a -50 mV en el que se desarrollan potenciales de acción de Ca^{2+} y Na^+ , y por encima de los -30 mV se activarían canales de K^+ (del tipo Kv3.4) que colaborarían en la repolarización.

La apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje permitiría la entrada de Ca^{2+} al citosol y la exocitosis de los gránulos de somatostatina. Las células δ generan una señal oscilatoria de Ca^{2+} a partir de concentraciones tan bajas de glucosa como 3 mM (figura 2). Esta mayor respuesta a la glucosa en comparación a las células β se

ha explicado debido a una menor densidad de canales K_{ATP} en las células secretoras de somatostatina (un 50 % menos). Con una menor densidad, la despolarización de membrana hasta llegar al potencial al que se generan los potenciales de acción tendría lugar mucho antes de que se generara una completa inhibición de los canales K_{ATP} en comparación con las células β , y por tanto, podrían responder antes a la glucosa.

Estudios recientes utilizando microscopía confocal redox en islote entero muestran que la glucosa aumenta el metabolismo aeróbico mitocondrial en célula δ , aunque del orden de cuatro veces menos que en el caso de la población β . Estos datos sugieren que el metabolismo de la glucosa en estas células tiene más similitud con el de la célula β , al contrario de lo que ocurre en α . Estos experimentos, junto a los existentes de electrofisiología y señal de Ca^{2+} , también sugieren que el canal K_{ATP} en célula δ juega un papel fundamental en acoplar cambios metabólicos en eléctricos en respuesta a la glucosa.

La regulación paracrina inducida por glucosa debe ser relevante en célula δ , sin embargo existen muy pocos trabajos abordando este aspecto en detalle. Dado que la célula β contiene gránulos con GABA que se cosecretan con los de insulina, y las células δ expresan receptores de GABA acoplados a canales de Cl^- , es plausible que el aumento de glucemia active esta señalización paracrina. La activación de estas corrientes de Cl^- posiblemente afecte a la actividad eléctrica de las células δ y a su secreción. Recientemente se ha visto también que el L-glutamato incrementa la liberación de somatostatina a bajas concentraciones de glucosa. En estas condiciones el L-glutamato es cosecretado con el glucagón desde las células α . Se ha demostrado que la población δ expresa receptores ionotrópicos de glutamato que mediarían este efecto positivo sobre la secreción de somatostatina.

Por último comentar que tanto la población de células δ como α , funcionan como unidades individuales a diferencia de lo que ocurre en la célula β que se comporta como un sincitio en ratón o en pequeños grupos coordinados en humano, tal como hemos mencionado anteriormente. Si bien trabajos clásicos utilizando transferencia de sondas fluorescentes indicaron la existencia de acoplamiento homólogo y heterólogo entre los tres tipos celulares del islote, estudios posteriores con técnicas electrofisiológicas y medidas de las señales de Ca^{2+} tanto en islotes de ratón como de humanos, demuestran que las células α y δ no están acopladas entre sí ni con otros tipos celulares, de manera que tienen un comportamiento individual.

5. Conclusiones.

Si bien cada tipo celular del islote tiene un papel particular con relación a la regulación de la glucemia, la función del islote depende de la integración de las respuestas de cada tipo celular y a sus interacciones, a parte de otros mecanismos de control como el neural. Si bien los estudios en líneas celulares y en células del islote aisladas aportan información relevante sobre la respuesta específica de una célula o tipo celular, es relevante estudiar también esta respuesta en el islote intacto, pues es en este escenario donde se integran los diferentes mecanismos de comunicación célula-célula, aproximándose en mayor medida a la realidad fisiológica.

Agradecimientos

Los laboratorios de los autores están financiados por el Ministerio de Educación y Ciencia y el Instituto de Salud Carlos III.

6. Bibliografía seleccionada

Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103: 2334-2339.

Gilon P, Shepherd RM, Henquin JC. Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic calcium as evidences in single pancreatic islets. *J Biol Chem*. 1993; 268: 22265-22268.

Gopel SO, Kanno T, Barg S, Rorsman P. Patch-clamp characterisation of somatostatin-secreting δ -cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol*. 2000; 528: 497-507.

Gopel SO, Kanno T, Barg S, Weng XG, Gromada J, Rorsman P. Regulation of glucagon release in mouse α -cells by KATP channels and inactivation of TTX-sensitive Na^+ channels. *J Physiol*. 2000; 528: 509-520.

Nadal A, Quesada I, Soria B. Homologous and heterologous asynchronicity between identified α -, β - and δ -cells within intact islets of Langerhans in the mouse. *J Physiol*. 1999; 517: 85-93.

Prentki M, Matchinsky FM. Ca^{2+} , cAMP and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev*. 1987; 67: 1185-1248.

Quesada I, Nadal A, Soria B. Different effects of tolbutamide and diazoxide in α , β and δ -cells within intact islets of Langerhans. *Diabetes*. 1999; 48: 2390-2397.

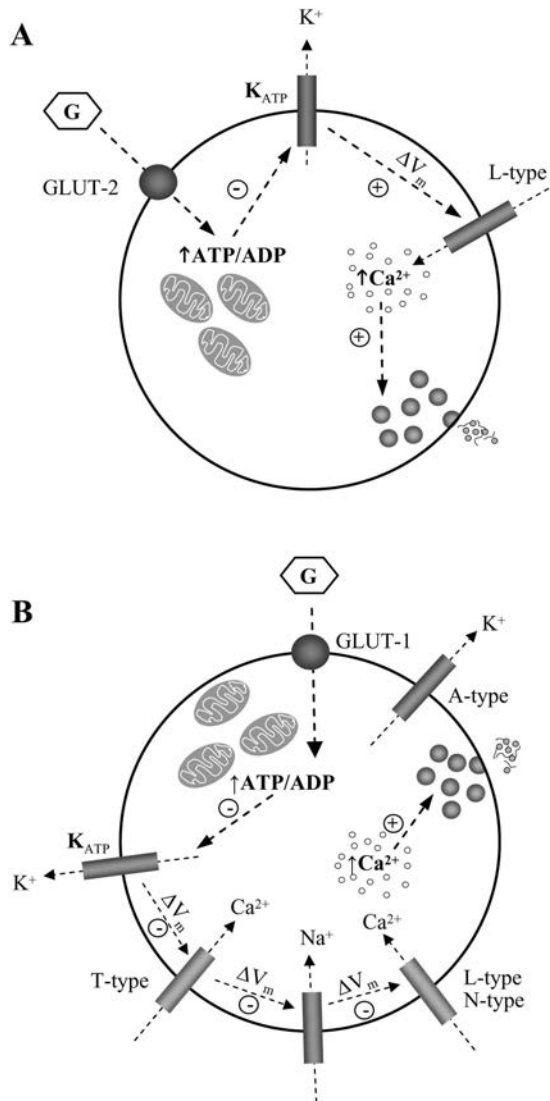
Quesada I., Todorova M.G., Alonso-Magdalena P., Beltrá M., Carneiro E.M., Martín F., Nadal A.,

Soria B. Glucose induces opposite $[Ca^{2+}]_i$ oscillatory patterns in identified α - and β -cells within intact human islets of Langerhans. *Diabetes*. 2006; 55: 2463-2469.

Quesada I., Todorova M.G., Soria B. Different metabolic responses of α , β and δ -cells monitored by redox confocal microscopy within the intact islet of Langerhans. *Biophys. J*. 2006; 90: 2641-2650.

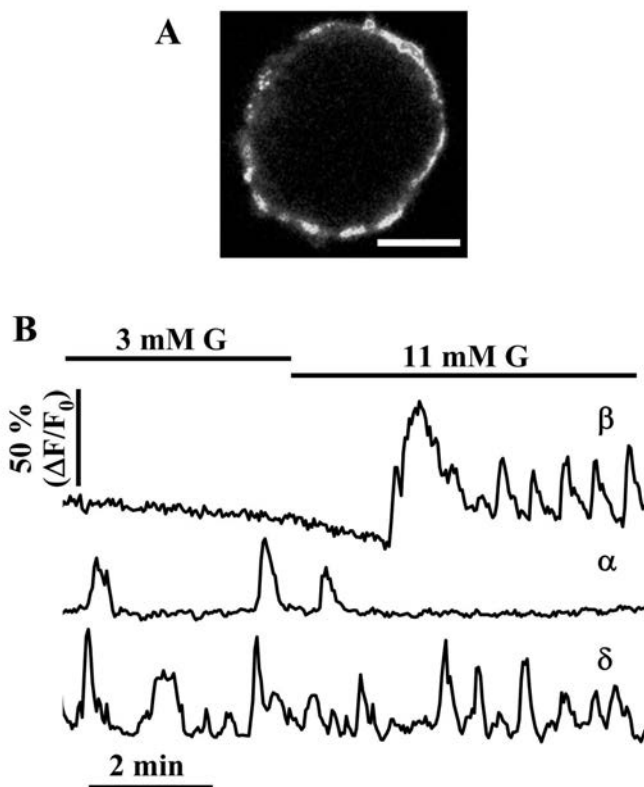
Santos RM, Rosario LM, Nadal A, Garcia-Sancho J, Soria B, Valdeolmillos M: Widespread synchronous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch*. 1991; 418: 417-422.

FIGURA 1



Modelo de acoplamiento estímulo-secreción en la célula b (A) y a (B). Ver texto para detalles acerca de estos dos modelos.

FIGURA 2



A. Imagen de un islote de ratón cargado con una sonda fluorescente sensible a Ca^{2+} . La imagen fue adquirida mediante microscopía confocal e ilustra una sección óptica de 8 mm. Barra de calibración = 100 mm.

B. Señales oscilatorias de Ca^{2+} en células α , β y δ al pasar de 3 a 11 mM glucosa (G).

CAPÍTULO 2

Autoinmunidad frente a los islotes en pacientes con diabetes mellitus tipo 1

AUTORES

M. Vives-Pi, A. Lucas*
R. Planas

Laboratori d'Immunobiologia per a la Recerca i les Aplicacions
Diagnostiques (LIRAD)
Banc de Sang i Teixits (BST)
Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i
Pujol

*Servei d'Endocrinologia
Hospital Universitari Germans Trias i Pujol
Badalona. Barcelona

1. Introducción

La autoinmunidad se define como una reacción del sistema inmunitario frente a componentes del organismo causada por una pérdida de tolerancia inmunológica. Cuando el sistema inmunitario causa daño tisular y afectación con manifestaciones clínicas, aparecen las enfermedades autoinmunitarias.

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es una enfermedad autoinmunitaria resultante de la destrucción de las células pancreáticas insulares productoras de insulina por un proceso destructivo selectivo. Los autoantígenos de células beta, linfocitos T y B, macrófagos y células dendríticas están involucrados en la patogénesis de esta enfermedad. Tras una etapa de autoinmunidad asintomática, la enfermedad suele manifestarse en la infancia o adolescencia, en el momento en que aproximadamente un 80% de las células beta ha desaparecido. Las evidencias existentes a favor de que la DM1 es una enfermedad de origen autoinmunitario en humanos se especifican en la tabla 1.

TABLA 1 Evidencias de autoinmunidad en la DM1	
AUTOINMUNIDAD	CARACTERÍSTICAS
Infiltrado insular leucocitario	T CD4, T CD8, Mø, DCs
Autoanticuerpos circulantes	ICA, IAA, anti-GAD, anti IA-2
Asociación con otras enfermedades AI	Tiroiditis, Addison, Anemia perniciosa, vitiligo
Asociación genética a HLA	Aumento del riesgo relativo para ciertos haplotipos
Transferencia de la enfermedad	Trasplante de médula ósea en gemelos idénticos
Efecto de inmunosupresores	Mejora de la enfermedad

A pesar de los importantes avances en el conocimiento de los fenómenos que acompañan esta pérdida de tolerancia hacia los autoantígenos insulares, la etiopatogenia de la enfermedad mantiene muchas incógnitas, entre ellas el elemento o elementos iniciadores del proceso. El estudio de la misma es complicado por el periodo asintomático y por la dificultad de acceder al tejido diana. Como en otras muchas enfermedades autoinmunitarias, hay factores que confieren susceptibilidad a desarrollar la enfermedad, pero que por sí solos no la desencadenan. Estos factores se clasifican en genéticos (HLA), ambientales (dieta, latitud, patógenos) e incluso estocásticos (repertorio clonotípico individual). En el caso de la predisposición genética, ciertos

haplotipos de los antígenos de histocompatibilidad de clase II (HLA-DR3/4, -DQ) así como otros loci de susceptibilidad (IDDM) contribuirían a una presentación más eficaz de un péptido relevante en la enfermedad; otros haplotipos confieren un papel protector. Evidencias epidemiológicas apuntan a la existencia de un papel crítico de los factores ambientales en el desarrollo de autoinmunidad contra la célula beta: concordancia de la enfermedad del 50% en gemelos univitelinos, variaciones geográficas, incidencia estacional, estudios epidemiológicos de emigrantes a zonas de mayor incidencia que resultan en un aumento de la enfermedad, dieta, patógenos etc. Respecto a los patógenos y su influencia en autoinmunidad, destaca la hipótesis de la higiene, según la cual, la exposición a patógenos contribuiría a la correcta maduración del sistema inmunitario; por tanto, en una sociedad avanzada con pocas infecciones, antibióticos, ausencia de parásitos y vacunación a edades muy tempranas, el sistema inmune no maduraría de forma correcta influyendo en la mayor incidencia de alergia y autoinmunidad en dicha población.

2. Alteraciones inmunológicas en el islote asociadas a DM1: antes, durante y después del inicio clínico

2.1 Antes

El inicio clínico de la diabetes coincide con la fase final de destrucción de las células beta, iniciados durante el período asintomático o prediabetes. Esta interesante etapa latente –de difícil estudio debido a la falta de manifestaciones y lo inaccesible del tejido diana– puede durar años. El único marcador de daño insular son los autoanticuerpos séricos, siendo los anti-insulina los primeros en aparecer. De esta etapa, se sabe que no todos los individuos con anticuerpos anti-islote desarrollarán la enfermedad, lo que significa que la autoinmunidad continúa de forma silente o bien acaba desapareciendo. La positividad para uno o varios autoanticuerpos anti-islote es determinante para la actividad de la respuesta autoinmunitaria que es muy activa en esta etapa, lo que sugiere que podría ser la mejor fase para utilizar la inmunomodulación preventiva. Datos obtenidos de modelos animales indican que esta fase se caracteriza por el inicio y progresión de la insulitis o infiltración leucocitaria de los islotes con el consiguiente establecimiento de un microambiente proinflamatorio. El avance de la destrucción se interpreta gracias a la descripción de los procesos de migración leucocitaria. Así, las células endoteliales de los capilares insulares regularían la llegada leu-

cocitaria a los tejidos y sus «poros» ayudarían a una rápida difusión de los mensajeros químicos entre la sangre y el espacio insular: la insulitis -infiltración leucocitaria de los islotes- va acompañada por un incremento de los elementos vasculares de los tejidos, dato que sugiere la participación activa del endotelio en el proceso patogénico de la DM1.

2.2 Durante

Los fenómenos autoinmunitarios en el islote al inicio clínico de la DM1 se han estudiado en los pocos casos de pacientes que han fallecido en esta etapa y en las biopsias pancreáticas que practican algunos grupos en Japón. Tras identificar la esperada disminución del número de células beta, se describió una infiltración leucocitaria relativamente escasa con predominio de linfocitos T CD4+ y CD8+ y algunos macrófagos. Parece ser que los macrófagos y las células dendríticas serían los primeros tipos celulares en infiltrar los islotes. La lesión inflamatoria de los islotes o insulitis, es una característica común en los escasos páncreas analizados histológicamente procedentes de pacientes diabéticos y se correlaciona, a nivel molecular, con una alteración de marcadores inmunológicos en las células beta (tabla 2): hiperexpresión de moléculas de HLA de clase I y clase II, aumento de moléculas de adhesión (ICAM-1, LFA-3, VLA-4), aumento de moléculas de transporte antigénico endógeno (TAP-1), Fas, así como depósitos de inmunoglobulinas y complemento. Todas estas moléculas están implicadas en la respuesta inmune. Este hecho otorga un papel 'activo' de la célula beta en el proceso de su desaparición, sugiriendo un incremento de la presentación antigénica por parte de la célula diana. A nivel del microambiente insular, se han definido alteraciones del patrón de expresión de citocinas y quimiocinas, observándose un perfil de citocinas proinflamatorio y característico de linfocitos T citotóxicos: (IFN- α , IFN- β e IL-6) y perforina. Los experimentos in vitro sometiendo islotes humanos a condiciones similares a las proinflamatorias y antivirales demuestran la capacidad de los islotes para producir quimiocinas proinflamatorias que podrían contribuir al 'homing' y activación de leucocitos y células autoreactivas en los islotes. En esta fase, se observan también fenómenos de puesta en marcha de procesos de regeneración de la célula beta con aparición de neoislotes a partir de ductos pancreáticos.

Estudios en modelos animales han determinado que la regulación de la respuesta hacia un componente Th1 conlleva la aparición de la enfermedad. Las citoquinas de tipo 1, producidas por linfocitos T (IFN- γ , TNF- α , IL-2 y IL-12) se relacionan con

una insulinitis destructiva, mientras que las de tipo Th2 (IL-4, IL-10) estarían asociadas con una insulinitis benigna. El reclutamiento de estas células hacia los islotes es un paso crítico en la patogénesis de la enfermedad. Las quimiocinas son citocinas que promueven la migración de células mononucleares, por lo que el tráfico hacia la célula diana, podría asociarse a la expresión temporal de quimiocinas, y que la polarización de la expresión de las mismas por células Th1 vs Th2 determinaría la composición de la insulinitis y la posterior destrucción o protección de las células beta. Resultados de estudios in vitro indican que las células beta de rata son capaces, bajo el estímulo de IL-1, de expresar ciertas quimiocinas que podrían afectar al reconocimiento de la célula beta por parte del sistema inmunitario.

TABLA 2

Alteraciones inmunológicas en páncreas de pacientes con DM1

ALTERACIÓN	LOCALIZACIÓN	REFERENCIA
Insulinitis con predominancia de linfocitos TCD8+	Islote y periferia insular	Bottazzo, 1985; Hanninen, 1992; Itoh, 1993; Somoza, 1994; Imagawa, 2001.
Hiperexpresión de HLA I	Islote	Bottazzo, 1985; Hanninen, 1992; Itoh, 1993; Somoza, 1994; Imagawa, 2001
Expresión "inapropiada" de HLA II	Islote	Botazzo, 1985; Foulis, 1986; Hanninen, 1992; Somoza, 1994; Imagawa, 2001
Hiperexpresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VLA)	Islote y endotelios	Hanninen, 1992; Itoh, 1993; Somoza, 1994
Hiperexpresión de TAP-1 (Transportador de péptidos)	Islote	Vives-Pi, 1996
Depósitos de anticuerpos IgG fijadores de complemento	Islote y periferia insular	Sai, 1984; Botazzo, 1985; Somoza, 1994
Pérdida de la expresión de autoantígenos (GAD, Insulina)	Células beta	Somoza, 1994; Imagawa, 2001
Presencia de perforina	Páncreas	Somoza, 1994
Expresión de Fas	Células beta y alfa	Stassi, 1997; Moriwaki, 1999
Presencia de mRNA de IFN- γ , IFN- α , IFN- β e IL-6	Páncreas	Foulis, 1987; Somoza, 1994; Yamagata 1996

2.3 Después

Tras el inicio clínico de la DM1, suele presentarse una etapa llamada ‘luna de miel’. Se define la ‘luna de miel’ como el periodo en que los requerimientos de insulina son inferiores al 50% de los iniciales. Esta etapa sugiere un ‘descanso’ de la célula beta tras la administración de insulina exógena y probablemente un intento de regeneración insular. A pesar de que existen pocos estudios de los fenómenos insulares que ocurren al iniciar la insulinización, parece ser que a partir de esta etapa irían disminuyendo las alteraciones inmunológicas observadas en el inicio clínico de la DM1: en páncreas de pacientes con más de diez años de evolución de la enfermedad ya no se detecta insulinitis, hiperexpresión de HLA clase I, moléculas de adhesión, inmunoglobulinas, complemento, y como es de esperar, tampoco células positivas para insulina. Sin embargo, estudios recientes demuestran la presencia de células beta remanentes en páncreas de pacientes de hasta 67 años de evolución de la enfermedad, que son más numerosas en pacientes con glicemias más bajas. Estos datos, junto con un aumento de la fibrosis periductal y la apoptosis de células beta implican una inflamación crónica con nueva formación/destrucción de células productoras de insulina. Algunos autores postulan que en esta etapa, la enfermedad podría remitir si se inhibiera la destrucción autoinmunitaria mediante el restablecimiento de la tolerancia.

3. Autoantígenos: ¿Protagonistas o figurantes?

Los antígenos son moléculas que portan una serie de determinantes antigénicos o epítomos que son reconocidos por anticuerpos o por el receptor de los linfocitos T (TCR) del sistema inmunitario específico y pueden iniciar una respuesta adaptativa. La mayoría son ajenos al individuo pero cuando un componente del propio organismo es reconocido por componentes del sistema inmunitario adaptativo, se denomina autoantígeno. Tanto en humanos como en modelos murinos, se han identificado numerosos antígenos y epítomos insulares frente a los que responden linfocitos T CD4 o CD8 autoreactivos y frente a los que se producen autoanticuerpos.

En la DM1 los autoantígenos se pueden dividir en función de su distribución tisular: en antígenos específicos de célula beta como la insulina, los derivados de la insulina y IGRP (Islet-specific Glucose-6-phosphatase catalytic subunit Related Peptide); antígenos neuroendocrinos como la carboxipeptidasa H, IA-2 (Insulinoma Associated Antigen), GAD65 (Glutamic Acid Decarboxylase), periferina y carbo-

xipeptidasa E y en antígenos de amplia expresión como hsp60 (Heat Shock Protein 60). Los mejor caracterizados –en función de la respuesta de autoanticuerpos– son la insulina, GAD e IA-2. La insulina es un autoantígeno diana según demuestran numerosos estudios en modelos animales. Además, el polimorfismo del gen de la insulina es un determinante importante en la DM1. El locus VNTR (variable nucleotide tandem repeat) afecta la expresión de la insulina en el timo y por tanto, puede influir en el establecimiento de la tolerancia central hacia dicha molécula.

Recientemente, se ha demostrado que la liberación de autoantígenos en DM1 y en otras enfermedades autoinmunitarias tiene un papel quimioatrayente de leucocitos, especialmente de células dendríticas inmaduras. Éste sería un mecanismo de alerta hacia el sistema inmunitario en forma de ‘señales de peligro’ para facilitar la reparación tisular y esto supondría, en algunos individuos predispuestos, el desarrollo de autoinmunidad.

4. La importancia de los marcadores de autoinmunidad

Durante el período asintomático de inicio y progresión de la destrucción de la célula beta aparecen anticuerpos circulantes anti-islote, marcadores de autoinmunidad humoral que identifican individuos en fase pre-diabética y que distinguen esta enfermedad autoinmunitaria de otras formas de diabetes mellitus. Hasta el momento, estos marcadores sirven, junto con los datos metabólicos, para llevar a cabo un mejor seguimiento del paciente. Los marcadores ICA (Islet Cell Antibodies) se detectan mediante inmunofluorescencia indirecta y se expresan en unidades JDF (Juvenile Diabetes Foundation). Engloban un conjunto de anticuerpos contra diferentes determinantes antigénicos, entre ellos GAD (Decarboxilasa del ácido glutámico), insulina e IA-2 (proteína tirosin-fosfatasa-like). Se han estandarizado ensayos moleculares específicos para la detección de cada anticuerpo: La mayoría de los pacientes pre-diabéticos y el 90% de los diabéticos presenta autoanticuerpos anti-GAD y/o IA-2. Los anticuerpos anti-insulina son muy determinantes en la fase pre-diabética en niños. La positividad de varios de estos anticuerpos incrementa el riesgo de desarrollo de la enfermedad y permite seleccionar a los individuos para ensayos clínicos de prevención. Los pacientes con DM1 tienen células T autorreactivas contra varios autoantígenos insulares lo que sugiere que, si bien en la fase

inductiva de la enfermedad la respuesta iría dirigida contra uno o unos pocos autoantígenos, la progresión de la destrucción requeriría el ‘esparcimiento’ de una serie de moléculas (GAD65, GAD67, ICA512, IA-2b, GM2-1 gangliósido, CPH, ICA69, Imogen, hsp65, periferina, REG, sinapsina...) que amplificarían la respuesta y darían paso a los autoanticuerpos contra moléculas de las células beta como consecuencia de la liberación del contenido citoplasmático. Otro parámetro inmunológico, además de los autoanticuerpos, es la determinación de linfocitos T autoreactivos contra antígenos insulares en pacientes diabéticos o individuos pre-diabéticos. Esta técnica, que se basa en la determinación de la capacidad de respuesta de los linfocitos T en sangre periférica a autoantígenos insulares está actualmente en fase de estandarización.

5. ¿Contribuyen las infecciones al proceso autoinmunitario que causa la DM1?

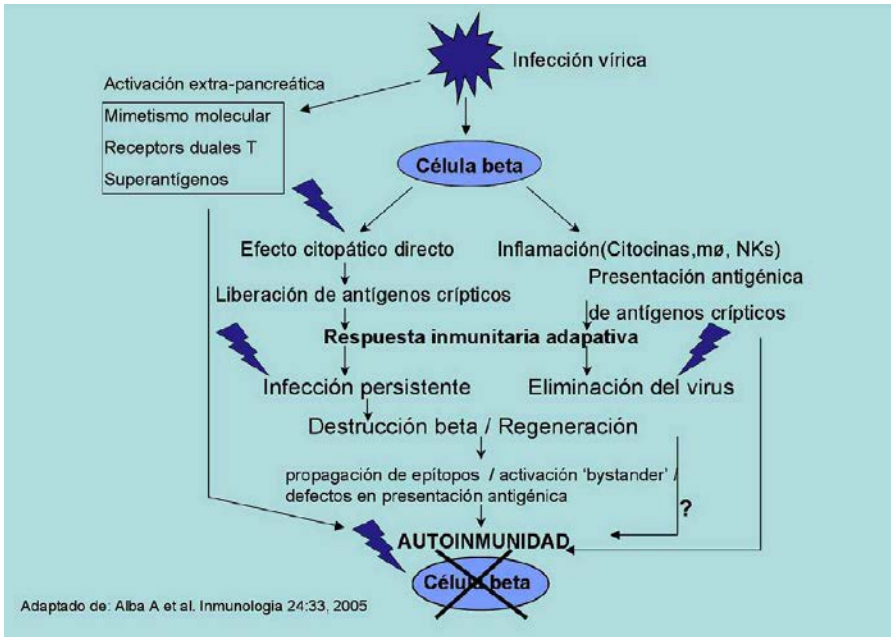
Además de la predisposición genética, los factores ambientales contribuyen a la susceptibilidad frente la DM1, ya que la concordancia de la enfermedad en gemelos univitelinos es tan sólo un 40-50%.

Las infecciones víricas se han relacionado indirectamente con la diabetes autoinmunitaria durante muchos años, en humanos y en modelos animales. Junto con la incidencia estacional de la enfermedad, la detección de virus en páncreas y en células mononucleares de sangre periférica de pacientes en el inicio de la DM1 y la presencia de interferones de tipo 1 –citocinas antivirales- en los islotes apoyan la hipótesis vírica en la etiología de la diabetes. Además, se han reportado varios casos clínicos de desarrollo de diabetes autoinmunitaria en pacientes con hepatitis viral crónica tras un tratamiento con interferones de tipo 1, principalmente con IFN- α . Algunos datos epidemiológicos recientes parecen indicar que las infecciones víricas como factor de riesgo tendrían más impacto en los individuos genéticamente menos predispuestos.

Se han propuesto distintos mecanismos para explicar la asociación entre virus y DM1: 1) La hipótesis más aceptada es el mimetismo molecular entre epítomos de proteínas propias de agentes infecciosos y epítomos de autoantígenos. Tras una infección vírica, podría darse una reacción cruzada y generarse una respuesta con-

FIGURA 1

Hipótesis sobre mecanismos de acción para explicar la asociación entre las infecciones víricas y la DM1:



1) Mimetismo molecular entre epítomos de proteínas propias de agentes infecciosos y epítomos de autoantígenos. Tras una infección vírica, una reacción cruzada generaría una respuesta contra epítomos de proteínas propias en individuos susceptibles; 2) La destrucción tisular y celular producida por una infección vírica puede comportar la liberación de nuevos epítomos ('epitope spreading') que de ser presen-

tados y reconocidos por linfocitos T autoreactivos, éstos podrían activarse e iniciar una respuesta autoinmunitaria. 3) Una inflamación del órgano diana en el contexto de una infección sería el desencadenante del proceso autoinmunitario, mediada por interferones de tipo 1, quimiocinas, citocinas proinflamatorias y otros factores de la inmunidad innata, que contribuirían a la activación de células T

autoreactivas. 4) Se ha propuesto la destrucción citolítica directa de las células beta aunque parece un mecanismo incompatible con el largo período asintomático que precede a la enfermedad. 5) Otra posibilidad es la presentación de nuevos epítomos procesados de una forma distinta después de una infección, o bien secuestrados hasta este momento en un órgano inmunoprivilegiado.

tra epítomos de proteínas propias en individuos susceptibles; este mecanismo podría estar implicado en la patogénesis de algunas enfermedades como la miocarditis post-viral o la enfermedad de Chagas. En referencia a la DM1 se ha observado, por

ejemplo, reactividad cruzada entre epítomos de GAD y coxsackievirus, citomegalovirus y rotavirus. 2) La destrucción tisular y celular producida por una infección vírica puede comportar la liberación de nuevos epítomos ('epitope spreading'). Si algunos de estos epítomos fueran presentados y reconocidos por linfocitos T auto-reactivos, éstos podrían activarse y proliferar, iniciando una respuesta autoinmunitaria. 3) Otra hipótesis sugiere que la inflamación del órgano diana en el contexto de una infección sería el desencadenante del proceso autoinmunitario: esta inflamación suele estar mediada por interferones de tipo 1, quimiocinas, citocinas proinflamatorias y otros factores de la inmunidad innata, que contribuirían a la activación de células T autoreactivas, de forma colateral e inespecífica. 4) La destrucción citolítica directa de las células beta se ha propuesto en algunas infecciones víricas en modelos animales. Aún y así, el mecanismo de una infección aguda de las células beta parece incompatible con el largo período asintomático que precede a la enfermedad en humanos. 5) Otra posibilidad es la presentación de nuevos epítomos, antes "epítomos crípticos", procesados de una forma distinta después de una infección, o bien secuestrados hasta este momento en un órgano inmunoprivilegiado. Sin embargo, todos estos mecanismos son hasta el momento hipotéticos, ya que no se ha podido demostrar una relación causa-efecto en la enfermedad en humanos. Estos mecanismos propuestos se resumen en la figura 1.

Hasta el momento más de una decena de virus, con y sin tropismo por el páncreas, han sido asociados a la DM1 en humanos y en modelos experimentales. Un ejemplo clásico es el virus de la rubéola -Rubella, que pertenece a la familia Togaviridae, ya que se ha visto que niños con síndrome de la rubéola congénito presentan una mayor incidencia de diabetes. Probablemente, los virus que más se han relacionado con la DM1 son los enterovirus (familia de los Picornavirus) y, dentro de este grupo, los echovirus y coxsackievirus A y B (especialmente el serotipo B4). Algunos estudios epidemiológicos sugieren una asociación entre infecciones por enterovirus y el posterior desarrollo de DM1. Se han detectado anticuerpos y respuesta de linfocitos T contra enterovirus en pacientes diabéticos. Además, se reportó un caso en el que se pudo aislar un virus del páncreas de un paciente diabético en el inicio clínico de la enfermedad: se trataba de una variante de coxsackievirus B4 que además era capaz de inducir la enfermedad en ratones. Los coxsackievirus son trópicos para las células beta humanas y el mecanismo que se propone para el desarrollo de la enfermedad es el mimetismo molecular. Los rotavirus, pertenecientes a la familia de los reovirus, son los principales causantes de gastroenteritis durante la infancia y se han relacionado también con DM1. Las infecciones por rotavirus

se han asociado a la aparición de autoanticuerpos específicos de islote, según datos epidemiológicos. Además, se ha observado una similitud entre epítomos de rotavirus VP7 y autoantígenos de islote (GAD e IA-2). Éstos son los ejemplos más evidentes, pero existen otros virus que también se han relacionado con la DM1 en humanos y en modelos animales, como el citomegalovirus, el virus de la encefalomiocarditis, el mengovirus, los retrovirus endógenos, el virus Epstein-Barr, el virus Ljungan, etc.

Por el contrario, a algunas infecciones también se les atribuye un papel protector frente a la DM1. La incidencia de la enfermedad ha aumentado notablemente en las últimas décadas en los países desarrollados, paralelamente a una mayor atención a la higiene y mejor control de las enfermedades infecciosas. También se ha observado, mediante estudios epidemiológicos, que el hecho de que los niños empiecen antes su etapa pre-escolar, asociada a sus primeras exposiciones a patógenos, tiene un efecto protector frente a la enfermedad.

6. Regeneración y autoinmunidad. ¿Un círculo vicioso?

En el inicio clínico de la DM1 la destrucción de la población celular beta alcanza el 80%. Las células beta humanas adultas tienen una baja tasa de replicación, pero en los últimos años se han publicado estudios que demuestran la existencia de regeneración de células beta incluso en pacientes diabéticos. En el páncreas de pacientes que murieron justo en el inicio clínico de la enfermedad, se detectan signos de regeneración y neoformación de islotes en zonas ductales. Además, en pacientes con hasta 67 años de evolución de la enfermedad siguen existiendo tanto células beta como apoptosis de éstas mismas, lo que sugiere la cronicidad de la autoinmunidad. Los mecanismos de regeneración propuestos son tres: la replicación de células beta preexistentes; la neoformación de células beta a partir de células ductales y la transdiferenciación a partir de otros tipos celulares.

REG es una familia de genes implicados en la regeneración de células beta. Las proteínas REG actúan de forma autocrina y paracrina a través de la interacción con su receptor (REG receptor), induciendo la proliferación de células beta. En humanos existen distintos genes pertenecientes a la familia REG: REG1 α , REG1 β ,

REG3 α , REG3 γ , REG4. Estos genes se expresan, entre otros tejidos, en islotes en procesos de regeneración y se hiperexpresan en condiciones de inflamación y diabetogénesis, en un intento de regeneración mediado en parte por REG para intentar contrarrestar la destrucción de células beta.

Sin embargo, REG podría tener un papel dual en la DM1, ya que por otro lado se ha descrito una respuesta autoreactiva contra REG en la enfermedad. En el modelo murino NOD, se aisló una clona diabetogénica TCD4⁺ REG3 α -específica a partir del infiltrado de islotes. Recientemente, se ha descrito la presencia de autoanticuerpos anti-REG en el 25% de pacientes con DM1 y en el 15% de pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Estos anticuerpos son neutralizantes de la actividad anti-REG in vitro. Estos datos indican que REG es a su vez un factor de regeneración y un autoantígeno en DM1. Así pues, el intento de regeneración paralelo a la destrucción de la masa celular beta podría contribuir al proceso autoinmunitario.

7. Inmunoterapia y perspectivas de futuro

Por el momento, no disponemos de prevención frente a la DM1 aunque ésta es la finalidad de los ensayos clínicos de administración de antígenos insulares. En sujetos con alto riesgo de desarrollar la enfermedad, pueden aplicarse tratamientos de tolerancia que sirvan para impedir su desarrollo, como es el caso de la administración de insulina a través de las mucosas. Esta insulina podría actuar, quizá como inmunomodulador, induciendo tolerancia o favoreciendo el ‘reposo’ de la célula beta. Por el momento, los resultados de estos ensayos no son excesivamente esperanzadores.

En la actualidad, se están desarrollando inmunoterapias en humanos para evitar o suprimir el desarrollo de la autoinmunidad contra la célula beta. Las estrategias terapéuticas se clasifican en base al aspecto inmunológico a tratar, es decir, inmunomodulación de linfocitos T (citocinas, anticuerpos anti CD3, dímeros péptido+HLA clase II y células T reguladoras), modulación de la inmunidad innata (alfa-galactosilceramida o péptido 277), vacunación antígeno específica (GAD e insulina) etc. Cabe destacar la terapia con anticuerpos monoclonales anti CD3 no mitogénicos que ha supuesto un éxito al restaurar la tolerancia hacia las células beta lo que se traduce en una remisión de la enfermedad. Además, numerosos estudios de nuevas inmunoterapias están en marcha en modelos experimentales.

Otros campos prometedores como la terapia génica, las células troncales, la regeneración de las células beta y el transplante de islotes -cuya finalidad es en todos los casos conseguir una fuente de insulina endógena con regulación metabólica- deben apoyarse en disminución del proceso autoinmunitario o de lo contrario puede suponer la recurrencia de la enfermedad.

A pesar de la expresión tímica de autoantígenos insulares, algunas células T autoreactivas frente al islote escapan del timo durante la tolerancia central, lo cual es un primer paso a la susceptibilidad a la enfermedad. Sin embargo, su activación se ve favorecida por factores genéticos, ambientales y por ciertas condiciones microambientales que capaciten a las células T en el entorno de la célula diana: frecuencia de precursores específicos autoreactivos, estado óptimo de activación y expresión de moléculas accesorias, accesibilidad del autoantígeno y posibilidad de encuentro con elementos ambientales que favorezcan el mimetismo y las reacciones inflamatorias. El órgano diana podría tener un papel activo en la presentación de antígenos, o quizá sería un daño inicial de la célula beta lo que dispersaría sus autoantígenos al entorno donde serían presentados por células presentadoras profesionales. Al mismo tiempo, la célula beta es capaz de producir quimiocinas y citocinas que atraerían a los componentes leucocitarios a un microambiente proinflamatorio. El ataque autoinmunitario y la persistencia de hiperglicemia causan un aumento en la producción de radicales libres que si se asocia a una disminución de las defensas antioxidantes, producto de los llamados genes de respuesta protectora (glutathione, HO-1, hsp...) puede aumentar la susceptibilidad al daño celular, al no bloquear la apoptosis mediada por NFkB. La presentación clínica de la enfermedad es el resultado de un complejo proceso en el que dominan los elementos inflamatorios y destructivos del propio sistema inmunitario frente a elementos reparadores o regeneradores del islote. La investigación sobre DM1 es un campo prioritario por la prevalencia y gravedad de la enfermedad. Es de esperar que los próximos avances en este campo consigan determinar las causas de la DM1 y conseguir su prevención mediante la aplicación de vacunas o tratamientos de tolerancia eficaces.

8. Bibliografía seleccionada

Bach JF, Chatenoud L: Tolerance to islet autoantigens in type I diabetes. *Annu. Rev. Immunol.* 19:131-61, 2001

Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PG, Gamble DR.

In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N Engl J Med.* 313:353-60, 1985

Foulis AK, Liddle CN, Farquharson MA, et al: The histopathology of the pancreas in type 1 diabetes: a 25 year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. *Diabetologia* 29:267-274, 1986

Hanninen A, Jalkanen S, Salmi M, Toikkanen S, Nikolakaras G, Simell O: Macrophages, T cell receptor usage, and endothelial cell activation in the pancreas at the onset of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 90:1901-1910, 1992

Honeyman M. How robust is the evidence for viruses in the induction of type 1 diabetes? *Curr Opin Immunol* 17:616-623, 2005

Imagawa A, Hanafusa T, Tamura S, et al: Pancreatic biopsy as a procedure for detecting in situ autoimmune phenomena in type 1 diabetes: close correlation between serological markers and histological evidence of cellular autoimmunity. *Diabetes* 50:1269-1273,

Meier JJ, Bhushan A, Butler AE, Rizza RA, Butler PC. Sustained beta cell apoptosis in patients with longstanding type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? *Diabetologia* 48:2221-2228, 2005

Shervani NJ, Takasawa S, Uchigata Y et al. Autoantibodies to REG, a beta-cell regeneration factor, in diabetic patients. *Eur J Clin Invest* 34: 752-758, 2004

Somoza N, Vargas F, Roura-Mir C, et al: Pancreas in recent onset insulin dependent diabetes mellitus: Changes in HLA, Adhesion molecules and autoantigens, Restricted T cell receptor

VB usage and cytokine profile. *J.Immunol.* 153:1360-1377, 1994

Vives-Pi M, Somoza N, Vargas F, Pujol-Borrell R. Overexpression of MHC proteins in pancreatic islets: a link between cytokines, viruses, breach of tolerance and Insulin Dependent Diabetes Mellitus. In: G. E. Blair, C.R. Pringle and D.J. Maudsley (Eds), *Mod*

Meier JJ, Bhushan A, Butler AE, Rizza RA, Butler PC. Sustained beta cell apoptosis in patients with longstanding type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? *Diabetologia* 48:2221-2228, 2005

Shervani NJ, Takasawa S, Uchigata Y et al. Autoantibodies to REG, a beta-cell regeneration factor, in diabetic patients. *Eur J Clin Invest* 34: 752-758, 2004

Somoza N, Vargas F, Roura-Mir C, et al: Pancreas in recent onset insulin dependent diabetes mellitus: Changes in HLA, Adhesion molecules and autoantigens, Restricted T cell receptor VB usage and cytokine profile. *J.Immunol.* 153:1360-1377, 1994

Vives-Pi M, Somoza N, Vargas F, Pujol-Borrell R. Overexpression of MHC proteins in pancreatic islets: a link between cytokines, viruses, breach of tolerance and Insulin Dependent Diabetes Mellitus. In: G. E. Blair, C.R. Pringle and D.J. Maudsley (Eds), *Modulation of MHC Antigen expression and disease.* Cambridge University Press, 1995, pp. 361-389

CAPÍTULO 3

Glucolipotoxicidad en la célula β y su relación con la diabetes tipo 2

AUTOR

Enrique Roche Collado

Profesor Titular de Universidad.
Departamento de Biología Aplicada, Área de Nutrición
Universidad Miguel Hernández. Alicante

1. Introducción

La célula β juega un papel central en la homeostasis de los nutrientes que llegan al organismo a través de la dieta, no sólo por ser capaz de fabricar y secretar la insulina, sino además por hacer que dicha secreción sea en el momento justo y en la cantidad adecuada. Para ello, la célula β es capaz a través de un sistema sensor de poder medir las concentraciones extracelulares de glucosa, el principal nutriente inductor del proceso secretor. Por otro lado, los ácidos grasos también son capaces de inducir la liberación de insulina, pero mecánicamente es necesaria la presencia de glucosa para inducir dicho efecto secretor. Este acoplamiento entre las concentraciones extracelulares del estímulo (glucosa o ácidos grasos) y la liberación de la hormona, se lleva a cabo a través de complejas rutas metabólicas, cuyo estudio ha sido un tema clave de investigación en los últimos años.

Mientras que las elevaciones posprandiales de glucosa generan una respuesta secretora aguda en la célula β , en la patología diabética el escenario cambia radicalmente. En estas circunstancias, las concentraciones circulantes de glucosa y ácidos grasos están anormalmente elevadas de forma crónica, resultando en una disfunción a nivel de la célula β que se caracteriza por un proceso secretor alterado y múltiples cambios fenotípicos. En estas circunstancias en las que los nutrientes glucosa y ácidos grasos están elevados de forma crónica, éstos se convierten en sustancias tóxicas que con el tiempo pueden llegar a provocar la muerte de la propia célula β . En este sentido, se acuñó el término de toxicidad a los nutrientes para explicar cómo una exposición crónica de la célula β a elevadas concentraciones de glucosa y ácidos grasos generaba cambios irreversibles que culminaban en la muerte de este tipo celular. Dado que no existe ninguna hormona que pueda reemplazar funcionalmente a la insulina, aparece la diabetes tipo 2. Cuando ésta se declara se pueden observar ciertos puntos coincidentes con la diabetes tipo 1. Así por ejemplo, en ambos casos la célula β sufre una destrucción, aunque en el caso de la diabetes tipo 1 es por causas autoinmunes, y en ambos casos el paciente debe recurrir a las inyecciones de insulina para salvar su vida. Recientes investigaciones se han centrado en averiguar las causas moleculares que subyacen a este proceso de toxicidad a los nutrientes permitiendo caracterizar las fases en las que éste se divide y la verdadera naturaleza de los cambios funcionales y fenotípicos más importantes que operan (Tabla 1).

TABLA 1

Fases caracterizadas en el proceso de toxicidad a los nutrientes.

FASE	CARACTERÍSTICAS
IGluc/Lipo-adaptación	Repuesta secretora aguda Homeostasis correcta de nutrientes
Gluc/Lipo-deoxificación	Respuesta secretora incrementada Activación de procesos detoxificadores Cambios fenotípicos y funcionales reversibles Posibilidad de intervención dietética-farmacológica
Gluc/Lipo-toxicidad	Respuesta secretora nula Activación de programas apoptóticos Cambios fenotípicos y funcionales irreversibles Necesidad de insulina inyectada

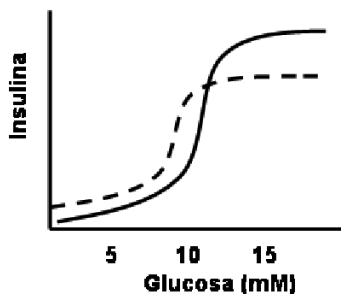
Las primeras investigaciones en este campo allá por los años 60, acuñaron el término de glucotoxicidad, indicando que las elevadas concentraciones circulantes de glucosa típicas de la patología diabética, eran la causa principal de esta disfunción observada a nivel de la célula β . Estudios posteriores en los años 80, acuñaron el término lipotoxicidad al observar la estrecha relación entre diabetes tipo 2 y obesidad, considerando de esta forma a los ácidos grasos como los factores desencadenantes de dicha disfunción celular. Aunque ambas hipótesis permitieron avanzar mucho en el campo, ninguna de las 2 lograba explicar satisfactoriamente los acontecimientos moleculares que concurrían en la diabetes tipo 2. De hecho, numerosos estudios in vitro e in vivo demostraron que la célula β era capaz de activar mecanismos de defensa (Tabla 1) para corregir las alteraciones producidas ante la presencia crónica de estos nutrientes. Además la glucosa per se no suele ser tóxica, ya que hay numerosos estadios fisiológicos en los que el azúcar está elevado en circulación, como por ejemplo tras una ingesta de sobrecarga o en determinadas patologías pancreáticas. Lo mismo podría decirse para los ácidos grasos que se encuentran elevados en situaciones de ayuno prolongado. Además un 50% aproximadamente de las personas obesas no son diabéticas y lo mismo se ha constatado en modelos animales bien establecidos, como la rata ZDF (Zucker Diabetic Fatty) frente a la ZF (Zucker Fatty).

Actualmente, el concepto emergente es el de glucolipotoxicidad, en el que las concentraciones elevadas tanto de glucosa, como de ácidos grasos conjuntamente serían la causa real y particular de la disfunción de la célula β en la diabetes tipo 2. En estas circunstancias, cuando ambos nutrientes están presentes y eleva-

dos al mismo tiempo, la célula β no puede activar correctamente su respuesta adaptativa y su capacidad detoxificadora. En la fase adaptativa, los cambios funcionales que concurren intentan asegurar una secreción adecuada a pesar del exceso de nutrientes y por tanto de demanda extracelular. Esto puede observarse porque la curva que monitoriza la cinética de secreción, muestra ya respuesta secretora a concentraciones muy bajas de azúcar, cuando en condiciones normales la célula β suele estar silente (Figura 1). Por otro lado, los mecanismos detoxificadores tienen como misión eliminar el exceso de moléculas señalizadoras intracelulares, que como respuesta a la elevada concentración extracelular de nutrientes, están generando informaciones erróneas en la propia célula. Sin embargo, estos cambios son el resultado de un proceso continuo y de acuerdo con el estado actual de los conocimientos, es muy difícil adscribirlos exclusivamente a una respuesta adaptativa o detoxificadora propiamente dicha.

FIGURA 1

Ejemplo representativo de una hipotética curva secretora de dosis dependencia en condiciones normales (línea continua) y en condiciones de glucolipotoxicidad (línea discontinua). Obsérvese que en la situación patológica existe ya una respuesta a bajas concentraciones de glucosa (alrededor de 5 mM) y que la curva alcanza una menor saturación y mucho antes que en la situación normal. En líneas generales se puede indicar que la célula β ha perdido la sensibilidad a la glucosa.



En cualquier caso, una caracterización detallada de estos aspectos es crucial, ya que éstos ocurren antes de la destrucción de la célula β por mecanismos apoptóticos. Todo ello implicaría por un lado la reversibilidad del proceso y la posibilidad de corregirlo antes de llegar a un “callejón sin salida”. Uno de los principales obstáculos que no ha permitido avanzar a un ritmo adecuado en este campo es la gran variedad de sistemas experimentales utilizados con sus correspondientes ventajas e inconvenientes. Éstos comprenden cultivos de líneas celulares, cultivo de islotes aislados y modelos animales. Así, en los cultivos se pueden utilizar concentraciones extremadamente elevadas de nutrientes que desarrollan sus

efectos tóxicos a los pocos días. Esto contrasta con lo que ocurre en humanos o en ciertos modelos animales, donde las concentraciones crónicas de nutrientes ya no pueden ser tan elevadas y los efectos tóxicos tardan en aparecer meses e incluso años.

Para poder comprender todo este proceso de la glucolipotoxicidad hay que tener en cuenta 2 observaciones clave que concurren en la propia célula β . Por un lado, los nutrientes glucosa y ácidos grasos son capaces de modular programas específicos de expresión de genes. Por otro lado, los metabolismos de la glucosa y de los ácidos grasos están interrelacionados. Así por ejemplo, las concentraciones intracelulares del precursor de la síntesis de ácidos grasos, el malonil-CoA, varían en función de la concentración intracelular de glucosa. Además la enzima encargada de la síntesis de malonil-CoA, la acetil-CoA carboxilasa, viene codificada por un gen regulado por la propia glucosa. Otro ejemplo que ilustra la conexión de ambos metabolismos, serían la utilización de intermediarios metabólicos de la glucólisis para sintetizar triglicéridos y diacilgliceroles.

Teniendo en cuenta estas premisas, se puede proponer que la glucolipotoxicidad sea un fenómeno que pudiera estar más cercano al desarrollo de la diabetes tipo 2 que las propias glucotoxicidad o lipotoxicidad. Aunque las evidencias experimentales son todavía muy escasas, se van a presentar algunos datos preliminares que podrían avalar dicha hipótesis. En cualquier caso, el caballo de batalla sigue siendo la transferencia de la experiencia acumulada *in vitro* y en modelos animales, a la situación real del paciente diabético tipo 2.

2. Glucolipotoxicidad

Como ya se ha señalado anteriormente, la evidencia experimental ha establecido que las concentraciones elevadas y persistentes de glucosa o de ácidos grasos por separado alteran el funcionamiento de la célula β , llegando a provocar la muerte de ésta por mecanismos de suicidio o apoptóticos. Sin embargo, los modelos experimentales también han revelado que ciertos mecanismos intracelulares de tipo adaptativo y/o detoxificador pueden retrasar e incluso corregir esta situación desfavorable (Tabla 2). Sin embargo, cuando ambos nutrientes se encuentran juntos en el medio extracelular y elevados al mismo tiempo, dichos

mecanismos son más ineficaces y la progresión hacia la muerte celular por apoptosis es más rápida.

2.1 Evidencias de glucolipotoxicidad en cultivos celulares in vitro

Estudios en islotes cultivados han mostrado que la exposición prolongada de éstos a altas concentraciones de glucosa (16,7 mM) y palmitato (0,5 mM), resultó en una disminución en la expresión del gen de la insulina y un incremento en los depósitos intracelulares de triglicéridos. Además, islotes aislados de la rata hiperglicémica y prediabética ZDF e incubados en presencia de ácidos grasos elevados presentaban apoptosis que podía prevenirse bloqueando las rutas de síntesis de ceramidas o de activación de la óxido nítrico sintasa inducible.

Tratamientos farmacológicos en estos modelos experimentales también permitieron restablecer la funcionalidad de los islotes y poder identificar la existencia de factores de transcripción específicos como mediadores del proceso de glucolipotoxicidad. Entre ellos cabe destacar por su interés SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein) y los PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors). La expresión de SREBP-1c se encuentra incrementada en condiciones de hiperglucemia en el medio de cultivo. Este factor es clave en la expresión de genes que codifican enzimas de la ruta lipogénica, observándose un incremento intracelular en los

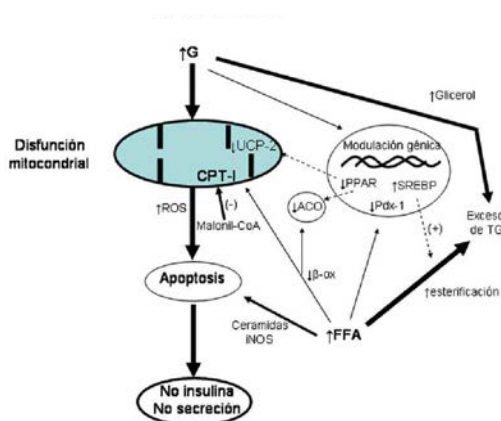
TABLA 2 Eventos moleculares que concurren durante las fases de glucoadaptación, glucodetoxificación, lipoadaptación y lipodetoxificación.	
Glucoadaptación Activación génica Metabolismo incrementado Aumento de la sensibilidad a la glucosa Secreción a bajas concentraciones de glucosa Hipertrofia e hiperplasia de la célula B	Glucodetoxificación Eliminación de glucosa* Incremento del estado redox Cataplerosis de citrato Esterificación lipídica Adaptación del ciclo celular
Lipoadaptación Activación génica Modulación metabólica Secreción de insulina alterada	Lipodeoxificación β-oxidación incrementada Desacoplamiento mitocondrial Deposición de triglicéridos

(*) Todavía por demostrar experimentalmente. Por ejemplo incrementando hipotéticamente la expresión o actividad de IGPR (islet-specific glucose-6-phosphate-related protein).

depósitos de triglicéridos. Esta deposición en condiciones de alta glucosa pudo evitarse induciendo un mutante dominante negativo en células cultivadas INS-1. Estos datos confirman que glucotoxicidad y lipotoxicidad están interrelacionadas y forman parte de un mismo fenómeno. Por otro lado PPAR- α es un factor de transcripción clave en la expresión de la acil-CoA oxidasa (enzima clave en la β -oxidación peroxisomal) y de la proteína desacopladora mitocondrial UCP-2. Ambas proteínas juegan un papel clave en el proceso de lipodetoxificación eliminando el exceso de lípidos intracelulares y preservando la función mitocondrial. La expresión de PPAR- α se ve severamente disminuida a altas concentraciones de glucosa, impidiendo con ello la eliminación del exceso de lípidos. A todo esto hay que unir el hecho de que el malonil-CoA también se encuentra elevado en estas condiciones de alta concentración de glucosa. Este metabolito, a parte de ser el precursor de la síntesis de ácidos grasos, es el inhibidor fisiológico de la carnitina-palmitoil transferasa I, la enzima clave en la β -oxidación mitocondrial y que también podría jugar un papel detoxificador clave eliminando el exceso de lípidos (Figura 2).

FIGURA 2

Esquema tentativo intentando enfatizar los puntos clave a nivel molecular en el proceso de glucolipotoxicidad. La glucolipotoxicidad ocurre cuando la glucosa (G) y los ácidos grasos libres (FFA) a elevadas concentraciones aparecen juntos. Bajo estas condiciones, dichos nutrientes son capaces de modular programas génicos específicos que imposibilitan la activación de mecanismos detoxificadores. La inhibición de la expresión de PPARs impide la expresión de la proteína desacopladora mitocondrial (UCP-2) y la acil-CoA oxidasa (ACO). La carnitina palmitoil transferasa I (CPT-I) es inhibida por la alta concentración de malonil-CoA como resultado de un metabolismo incrementado de la glucosa. La baja expresión de la ACO y la inhibición de la CPT-I dan como resultado una reducción en la β -oxidación (β -ox) de los ácidos grasos en exceso. Los procesos de esterificación se ven favorecidos por la inducción de la expresión de SREBP-1c por la alta concentración de glucosa, que contribuye también proporcionando esqueletos de glicerol para la biosíntesis de triglicéridos (TG). Se establece una disfunción mitocondrial progresiva con producción de radicales libres del oxígeno (ROS) y activación de



mecanismos apoptóticos por parte de los propios ácidos grasos, como síntesis de ceramidas y activación de la sintetasa inducible del óxido nítrico (iNOS). El gen de la insulina no se expresa en estas condiciones por una inhibición de la expresión de factores de transcripción clave, como Pdx-1. todo ello conjuntamente da como resultado una carencia en la producción de insulina y una secreción defectuosa. Ver el texto para más detalles"

De todo ello se deduce que ciertas estrategias farmacológicas dirigidas a modular la expresión de estos factores de transcripción, podrían ser efectivas en el tratamiento de la diabetes tipo 2, muy probablemente retrasando la aparición de las alteraciones descritas. En este sentido, activadores farmacológicos de los PPARs han permitido restaurar muchas de las alteraciones funcionales de la célula β , abriendo un campo de posibilidades muy interesantes que merecen ser exploradas en mayor detalle.

2.2 Evidencias de glucolipotoxicidad en modelos animales

Aunque ninguno de los sistemas animales existentes reproduce con fidelidad los eventos que concurren en el desarrollo de la diabetes tipo 2 en humanos, existen modelos que permiten obtener información parcial de algunas fases de la enfermedad. Quizás, las evidencias más sólidas han venido de los modelos genéticos de diabetes, en particular de la rata ZDF. Este animal desarrolla síntomas de la enfermedad de una forma muy rápida durante su etapa adulta, presentando hiperglucemia, hiperlipidemia y acumulación de triglicéridos en los islotes. La aparición de todos estos síntomas es coincidente con un fallo funcional y progresivo a nivel de la célula β . Por lo tanto, además de tener un defecto génico en el receptor de la leptina, la rata ZDF tiene una secreción de insulina deficiente, lo que la distingue de la rata ZF, que siendo obesa no llega a desarrollar enteramente diabetes.

Determinadas manipulaciones, como una restricción en la ingesta, o tratamientos farmacológicos permiten retrasar o incluso impedir la progresión hacia la diabetes en la rata ZDF. Estos estudios han revelado que agentes hipolipemiantes como el bezafibrato, aunque fueron efectivos a nivel sistémico, no lograron disminuir los depósitos de triglicéridos de los islotes ni normalizar los niveles de expresión del gen de la insulina. Por el contrario, si se aplicaba un agente hipoglucemiante, como la florizina se lograba eliminar los triglicéridos en el islote y restituir la expresión de la insulina, aunque los niveles de triglicéridos plasmáticos permanecían elevados. Todos estos resultados parecen apoyar la hipótesis de la glucolipotoxicidad, indicando que la hiperlipidemia no es suficiente para causar lipotoxicidad, tal y como se constata en la rata ZF. Sin embargo, el aumento progresivo en la glucemia en un entorno de hiperlipidemia (rata ZDF), crea las condiciones idóneas para la progresión hacia la intolerancia a la glucosa y la diabetes tipo 2.

Diversos mecanismos son operativos para compensar la disfunción generada en la célula β , así como las posibles pérdidas celulares por apoptosis. En este sentido, la

proliferación a nivel del islote intenta compensar la resistencia a la insulina y los defectos secretores a corto plazo. Sin embargo, la apoptosis creciente impide desarrollar dicha respuesta adaptativa en la rata ZDF a más largo plazo. Los ligandos de los PPARs, como rosiglitazona y troglitazona, protegen a la célula β contra la apoptosis cuando son administradas en estadios prediabéticos de hiperglucemia. La leptina también parece jugar un efecto protector en este modelo animal, reduciendo la acumulación de triglicéridos a nivel del islote al activar mecanismos de eliminación de éstos por β -oxidación. Sin embargo, estos mecanismos parecen funcionar más eficientemente en periodos de prediabetes, cuando otros agentes estresantes como la glucosa apenas son operativos.

Resultados muy similares han sido reproducidos en otros modelos animales como la rata OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) y la rata GK (Goto-Kakizaki), confirmando la teoría de la glucolipotoxicidad. La rata OLETF se caracteriza por presentar una hiperglucemia y una hiperlipidemia progresivas, con posibilidad incluso de producir fibrosis a nivel de los islotes. Una característica clave que la diferencia de la rata ZDF es que sus receptores de leptina son funcionales y que estas disfunciones mencionadas suelen aparecer tarde en el ciclo vital del animal, por lo que muchos investigadores señalan que este modelo se asemeja más a la diabetes tipo 2 de los humanos. Estas alteraciones pueden retrasarse o prevenirse con fármacos ligandos agonistas de PPAR- α (fenofibrato) y PPAR- γ (rosiglitazona), observándose al mismo tiempo un mantenimiento de la funcionalidad de los islotes. La rata GK desarrolla una diabetes tipo 2 que no viene acompañada de obesidad. Parece ser que estas ratas tienen un contenido en insulina menor (60% del normal) debido a una masa de célula β reducida, lo que genera una situación de hiperglucemia crónica. Si la condición diabética se agrava en este modelo animal, por ejemplo mediante una pancreatectomía, se observa que las células β residuales carecen de la capacidad para regenerarse. Por otro lado, una dieta rica en grasa afecta a la respuesta secretora e induce la expresión de UCP-2. La administración de un 30% de sacarosa en el agua de bebida incrementa la tasa de apoptosis en la célula β por mecanismos mediados por desequilibrio oxidativo. La normalización de la glucemia con florizina produce una recuperación parcial de la funcionalidad a nivel de la célula β en la rata GK.

Respecto a modelos de ratón, el equivalente a la rata ZDF, el ratón db/db también presenta recuperación funcional del islote al tratar con pioglitazona, reduciendo los niveles de triglicéridos. El tratamiento con antioxidantes también resulta beneficioso en este modelo animal.

2.3 Evidencia en humanos

La diabetes tipo 2 es una enfermedad multifactorial en la que los componentes ambientales y la predisposición genética juegan un papel esencial. La transferencia de todo el conocimiento acumulado con los diferentes modelos celulares y de animales es todavía muy compleja. Las evidencias directas de glucolipotoxicidad en humanos todavía son escasas. Los estudios observacionales en determinados grupos han podido dar algunas claves en este sentido. Así, los indios Pima han sido uno de esos grupos de estudio por su elevada prevalencia de la enfermedad y la limitada variabilidad genética. Estos indios desarrollan diabetes tipo 2 conjuntamente con obesidad, resistencia a la insulina, disfunción en la secreción y gluconeogénesis hepática incrementada. Un reciente estudio longitudinal ha establecido que la intolerancia a la glucosa (hiperglucemia) viene acompañada de un aumento de peso y resistencia a la insulina. Los estudios postmortem han confirmado en estos indios una reducción de la masa de célula β debida a mecanismos apoptóticos.

Sin embargo, tal y como se ha apuntado antes, son necesarios más estudios para poder encontrar evidencias de que la glucolipotoxicidad juega un papel preponderante en el desarrollo de las disfunciones a nivel del islote en la diabetes tipo 2 en humanos.

3. Discusión

La complejidad para entender la diabetes tipo 2 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. Está claro que la dieta es un pilar básico, dado el efecto adverso de los nutrientes cuando éstos se encuentran elevados de forma crónica. Sin embargo, esto requiere pacientes motivados y preparados, que controlen día a día las calorías ingeridas. Por otro lado, la diabetes se diagnostica en la mayoría de los casos demasiado tarde para que una intervención dietética pueda tener efectos positivos, recurriendo en estos casos al tratamiento farmacológico e incluso a la inyección de insulina.

Por ello, es esencial conocer los cambios moleculares que operan en la célula β en condiciones de glucolipotoxicidad por 2 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 a tiempo y adecuado. 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 β pancreática. A día de hoy, no se dispone de marcadores específicos de la progresión de la enfermedad ni de tratamientos farmacológicos eficientes al 100%. 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.

La tecnología de los biochips (microarrays) puede ser una herramienta muy valiosa en la investigación básica en célula β en condiciones de glucolipotoxicidad. Desde luego, el siguiente paso es validar los resultados obtenidos en modelos animales de la enfermedad e incluso en los propios pacientes diabéticos. Los primeros intentos realizados por nuestro laboratorio en colaboración con el laboratorio del Dr Marc Prentki (Universidad de Montreal, Canadá) en células INS-1 han revelado cambios importantes en grupos de genes clave para el funcionamiento de la célula β , como por ejemplo factores de transcripción, moléculas de señalización, enzimas metabólicos, proteínas apoptóticas y componentes de la maquinaria exocitótica.

Respecto al tratamiento farmacológico, las evidencias experimentales apuntan que los ligandos de los PPARs podrían jugar un papel clave en el tratamiento de las alteraciones observadas en condiciones de glucolipotoxicidad. Sin embargo, éste es todavía un campo muy incipiente y quedan muchas cuestiones sobre la mesa. La primera hace referencia al amplio abanico de tejidos sobre los que estos compuestos pueden ejercer su acción. En este sentido, sería necesario encontrar ligandos que actuaran más específicamente a nivel de la célula β . En segundo lugar, todavía se desconoce el perfil de expresión de los PPARs en células β humanas en condiciones normales y en condiciones patológicas. En tercer lugar, serían necesarios estudios farmacocinéticos para establecer la dosis y el tiempo de actuación de los fármacos en el organismo. Finalmente, los PPARs no

son los únicos factores de transcripción cuya expresión está alterada en condiciones de glucolipotoxicidad, sino que existen muchos otros factores cuya posible modulación farmacológica todavía no ha sido conseguida con éxito en modelos experimentales.

Por otro lado, los procesos de muerte celular (apoptosis) que concurren en la célula β vienen mediados, al menos parcialmente, por mecanismos de desequilibrio oxidativo. Por ello tratamientos farmacológicos basados en la administración de determinados antioxidantes podrían tener también un cierto sentido. Esto viene además corroborado por una presencia muy escasa de antioxidantes endógenos generados por la propia célula β . De esta forma, el tratamiento con N-acetil cisterna o aminoguanidina en diversos modelos animales y células cultivadas redujo considerablemente los efectos deletéreos causados por la glucolipotoxicidad. Sin embargo y al igual que en el caso anterior, todavía quedan muchos puntos por resolver en este respecto. En primer lugar, hay que definir las dianas sobre las que deben actuar estos agentes antioxidantes para inducir una mejoría en la función de la célula β . Las posibles dosis de antioxidantes y los tiempos de actuación todavía están por determinar con más precisión.

Finalmente y dado que la apoptosis parece ser el mecanismo dominante de muerte celular en el caso de la célula β en condiciones de glucolipotoxicidad, cabría esperar que la administración de fármacos antiapoptóticos podría jugar un papel relevante a este respecto. Para ello sería importante nuevamente definir las rutas implicadas en este proceso en la patología humana y encontrar marcadores específicos que permitieran el seguimiento y progresión de la enfermedad. En conclusión, aunque se ha avanzado mucho en este campo, la búsqueda de tratamientos farmacológicos más dirigidos y efectivos sigue siendo un desafío para la ciencia actual. La caracterización molecular de los cambios funcionales que operan en condiciones de glucolipotoxicidad es necesaria para poder seguir avanzando en este terreno.

Un punto interesante a considerar es que esta hipótesis de la glucolipotoxicidad podría además encontrar también interesantes implicaciones en la diabetes tipo 1. Aunque ha quedado muy bien establecido el componente autoinmune en esta patología, cabría señalar la existencia de una etapa conocida como de “luna de miel” que suele ser de duración variable y que todos los pacientes suelen experimentar antes de proceder a las inyecciones de insulina. De hecho esta fase requiere bajas dosis de insulina y algunos pacientes, los menos, suelen restaurar la función secre-

tora y detener la progresión hacia una diabetes abierta. Se podría postular que la presencia de sustancias tóxicas en circulación, posiblemente altas y persistentes concentraciones de glucosa y ácidos grasos, podrían detener o interferir con la recuperación de la célula β . Esto podría explicar el fallo secretor de los modelos animales diabéticos por inyección de estreptozotocina, donde el componente inmunitario es inexistente. Por otro lado, el trasplante de islotes podría representar un interesante modelo de estudio de glucolipotoxicidad, estableciendo de esta forma pautas que permitan la supervivencia y la efectividad funcional del implante.

Por todo ello, aunque todavía queda mucho por estudiar, está claro que el deterioro de la célula β parece ser progresivo en condiciones de hiperglucolipemia y parece estar relacionado con el tipo de nutriente, su concentración y tiempo de exposición. La investigación básica en este sentido es crucial para diseñar estrategias preventivas y terapéuticas que permitan retrasar e incluso frenar la progresión de la diabetes tipo 2. La extensión de estos conocimientos a la diabetes tipo 1, de ser posible, supondría también un importante campo de actuación en el tratamiento de esta patología.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias a una ayuda concedida por la Generalitat Valenciana a Enriqué Roche: GV06/334.

4. Bibliografía seleccionada

1. Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes*. 2002; 51 Suppl 3: S405-13.

2. Prentki M, Roduit R, Lameloise N, Corkey BE, Assimacopoulos-Jeannet F. Glucotoxicity, lipotoxicity pancreatic beta cell failure: a role for Malonyl-CoA, PPAR- α and altered lipid partitioning. *Canadian Journal of Diabetes Care*. 2001; 25: 36-46.

3. Robertson RP, Harmon J, Tran PQ, Poitout V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004; 53 Suppl 1: S119-124.

4. Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem*. 2004; 279: 42351-4.

5. Chan CB, Saleh MC, Koshkin V, Wheeler MB. Uncoupling protein 2 and islet function. *Diabetes*. 2004; 53 Suppl 1: S136-42.

6. Biden TJ, Robinson D, Cordery D, Hughes WE, Busch AK. Chronic effects of fatty acids on pancreatic beta-cell function: new insights from functional genomics. *Diabetes*. 2004; 53 Suppl 1: S159-65.

7. Hui H, Dotta F, Di Mario U, Perfetti R. Role of caspases in the regulation of apoptotic pancreatic islet beta-cells death. *J Cell Physiol*. 2004; 200: 177-200.

8. Kim HI, Ahn YH. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the glucose-sensing apparatus of liver and beta-cells.

Diabetes. 2004; 53 Suppl 1: S60-5.

9. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. 2004; 53 Suppl 1: S110-8.

10. Rhodes CJ. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science*. 2005; 307: 380-4.

CAPÍTULO 4

Lesión y Supervivencia de las Células β Pancreáticas

AUTORES

Francisco Bedoya*

Juan Tejedo**

Gladys Cahuana***

*Catedrático de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla

**Contratado Doctor de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla

***Ayudante de la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla

La evidencia acumulada por un número considerable de artículos experimentales y clínicos indica que un descenso relativo ó absoluto de la masa de células β pancreáticas es el común denominador de la diabetes tipo 1 y tipo 2. La reserva funcional del páncreas endocrino es considerable, por lo que los síntomas clínicos de comienzo de la enfermedad en el caso de la diabetes tipo 1 o de empeoramiento del cuadro metabólico en el caso de la diabetes tipo 2 aparecen cuando la masa de células β pancreáticas es inferior al 10-20%. Una estrategia terapéutica eficiente debería combinar el control de los factores causales de la enfermedad junto con la protección de la masa de célula β residual y la atenuación de los factores agravantes (control glucémico, control del sobrepeso, etc).

No hay abordajes eficaces que combatan el proceso destructivo de la célula β pancreática y tampoco hay tratamientos etiológicos para esta enfermedad. Por ello, la protección frente al ataque inmunitario específico (diabetes tipo 1) ó natural (diabetes tipo 2) pudiera constituir un objetivo de investigación con buenas perspectivas de aplicación en el tratamiento de ambas formas de diabetes.

Los aspectos relacionados con la proliferación, supervivencia y destrucción de la célula β pancreática ha sido objeto de estudio por varios grupos de investigación a lo largo de los 15 últimos años. Sus investigaciones y las de otros laboratorios están generando un modelo patogénico en el que la muerte celular por apoptosis de la célula β junto con una capacidad limitada de regeneración de la célula β a partir de sus células progenitoras conducen a una insuficiencia del páncreas endocrino para controlar el metabolismo energético del organismo. Los efectos colaterales de esta pérdida de control conducen a complicaciones importantes que están asociadas con una glucemia elevada. La muerte de la célula β es el factor clave en la diabetes tipo 1, ya que cuando la masa celular disminuye por debajo de unos niveles críticos, aparecen los síntomas clínicos que a su vez son reflejo de la hiperglucemia grave y de las complicaciones metabólicas resultantes. En cambio, este proceso destructivo tiene un papel más insidioso en la diabetes tipo 2, ya que los estudios sobre la masa de células β en la diabetes tipo 2 muestran resultados contradictorios. Ello sea debido probablemente a que la masa de células β varía a lo largo de la historia natural de la enfermedad. Una evidencia clara del papel de la muerte celular en estadios tardíos de diabetes tipo 2 proviene de estudios realizados en modelos animales de diabetes tipo 2 como el roedor *Psammomys obesus*, que desarrolla la enfermedad durante el cautiverio y cuando es alimentado con una dieta rica en energía. Entonces, la enfermedad se inicia con hiperinsulinemia/normoglu-

cemia y resistencia a la insulina y evoluciona a hiperglucemia y muerte de la célula β . Una situación parecida podría tener lugar en personas en las que la evolución de su diabetes conduce a un estado en el que se necesita la administración de insulina para controlar la glucemia. La evidencia experimental sugiere que la hiperglucemia y otros factores como una concentración elevada de ácidos grasos libres están implicados en el proceso de muerte celular apoptótica de la célula β pancreática en estos casos de Diabetes tipo 2 insulino dependiente.

La apoptosis es un proceso de muerte celular regulada que participa en el modelamiento del organismo durante el desarrollo embrionario y en el control de las poblaciones celulares en la vida adulta. Tanto el exceso de muerte apoptótica como su defecto están actualmente implicados en el desarrollo de numerosas enfermedades. Esta vía de muerte programada está regulada de una manera compleja y básicamente consiste en su control por señales extracelulares de muerte que ponen en marcha un proceso autodestructivo en el que la mitocondria actuaría como arsenal que libera factores apoptogénicos que inician un proceso de destrucción de proteínas claves para la supervivencia celular y del ADN. Estas señales extracelulares de muerte pueden ser proteínas producidas por otras células que este caso actuarían como inductoras de muerte, pero también pueden ser moléculas pequeñas que pueden llegar a ser tóxicas para células con defensas disminuidas ó incluso factores ambientales como radiaciones, o sustancias presentes en los alimentos.

Es importante resaltar que la muerte celular por apoptosis es consecuencia de una acción predominante de factores denominados pro-apoptóticos y que las células tienen mecanismos de defensa que contrarrestan buena parte de las señales exógenas de muerte que está recibiendo. Por ello, el destino final de la célula resulta de la capacidad que tienen sus sistemas de defensa para contrarrestar el ataque.

Dada la complejidad del proceso de muerte celular por apoptosis y de su regulación, los estudios experimentales realizados en modelos animales y celulares de diabetes tipo 1 y 2 muestran un escenario diverso. Los estudios realizados con tejido pancreático pacientes diabéticos fallecidos por otras causas, han sido poco reveladores ya que dado el carácter progresivo de este proceso destructivo, sólo en algunos casos se ha encontrado evidencia clara que muestre un proceso apoptótico activo, ya que ésta es una muerte limpia, que no suele dejar huellas.

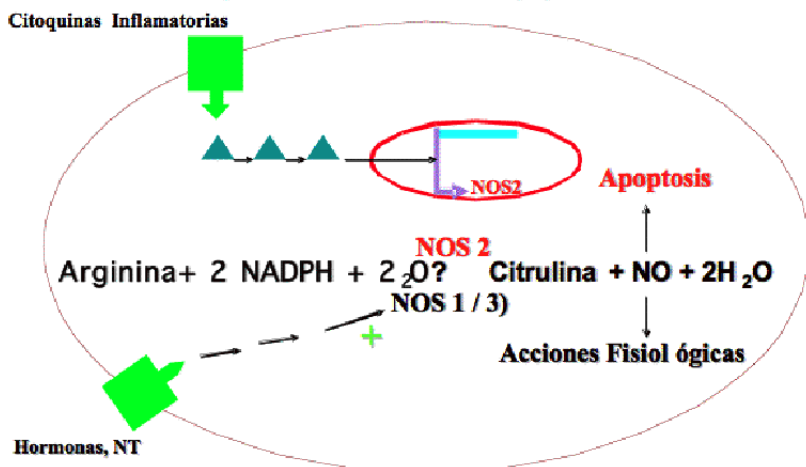
Por todo ello, los modelos animales y celulares de diabetes tipo 1 fundamentalmen-

te han sido muy útiles para perfilar el proceso apoptótico en la célula β . La naturaleza de los antígenos celulares, su mecanismo de presentación al sistema inmune y la reacción anómala de este sistema que subyacen a todo el proceso son expuestos en otro capítulo de esta monografía.

En lo que se refiere a los mecanismos de destrucción celular propiamente dichos, las citoquinas solubles del tipo interleuquina 1β , interferón γ y factor de necrosis tumoral alfa tienen una acción apoptótica marcada sobre células β y podrían por tanto estar implicados en el proceso destructivo en la diabetes. Buena parte de las acciones deletéreas de la interleuquina 1β dependen de la producción de óxido nítrico en el interior de la célula. Esta molécula tiene diversas acciones dependiendo de su concentración en el interior de la célula y de su combinación con otras moléculas generadas en situaciones de estrés oxidativo. La interleuquina-1 induce la expresión de una forma muy activa de la enzima que cataliza la generación de óxido nítrico a partir del aminoácido arginina la isoforma 2 de la sintasa del óxido nítrico (NOS2). En estas condiciones, la producción de altas concentraciones de óxido nítrico desborda los mecanismos de neutralización que por otra parte son poco eficaces en la célula β y por tanto se pone en marcha el proceso de destrucción celular por apoptosis.

Regulación de la Apoptosis en la Célula ?

La generación de Óxido Nítrico (NO) es una etapa clave en la puesta en marcha de la apoptosis



El estrés oxidativo inducido por el óxido nítrico conduce a una peroxidación lipídica con generación de productos derivados de la peroxidación avanzada que inducen una alteración oxidativa importante de proteínas mitocondriales implicadas en la apoptosis. La mitocondria es un almacén de moléculas proapoptóticas y alteraciones incluso transitorias de su permeabilidad conducen a la salida de factores como el citocromo c y otras moléculas bien caracterizadas. El citocromo c así liberado en el citoplasma participa en la activación de proteasas que degradarán sustratos proteicos específicos. Otros factores mitocondriales como el Factor Inductor de Apoptosis (AIF) y SMAC/DIABLO estimulan procesos apoptóticos en el núcleo (fragmentación del ADN “en escalera”) ó neutralizan inhibidores naturales de la apoptosis cuya función es la de bloquear activaciones espontáneas de la cascada apoptótica. Pues bien, la salida de factores apoptogénicos está controlada por cambios transitorios en su permeabilidad iónica. La estructura responsable del trasiego de iones y agua y que está implicada en el proceso apoptótico, es un complejo multiproteico denominado poro PT. Un componente clave de este poro PT es la proteína transportadora de nucleótidos de adenina (ANT). Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que esta proteína es una diana del daño oxidativo inducido por el óxido nítrico; otra proteína implicada en el control de la apoptosis es Bcl-2, que desempeña múltiples funciones como las de formar dímeros y neutralizar las acciones proapoptóticas de otras proteínas de su familia, o actuar como antioxidante eficaz. Esta proteína está incrustada en las membranas de organelas subcelulares como mitocondria y núcleo. Nuestro grupo ha observado que la degradación de esta proteína es un acontecimiento inicial en el proceso apoptótico iniciado por el óxido nítrico en las células secretoras de insulina y que su carbonilación es un marcador para su degradación. Estos hallazgos proceden de estudios con inhibidores de la carbonilación, en los que se aprecia una inhibición de la degradación de la proteína Bcl-2, así como un bloqueo de las acciones apoptóticas del óxido nítrico. Datos recientes sugieren que el proceso de apoptosis en células β es dependiente de una sobrerregulación y subregulación transcripcional paralela y/o secuencial de un considerable número de genes.

Pero el óxido nítrico desempeña otras funciones relevantes para la fisiología de la célula β . Cuando se produce en cantidades moderadas, juega un papel regulador de la respuesta secretora de esta célula. Además, es un potente factor contra la apoptosis producida por la ausencia de factores tróficos. Nuestro grupo ha descrito que la producción de bajas concentraciones de NO -bien generado exógenamente o bien generado dentro de la célula por activación de las isoformas constitutivas (NOS1 y

NOS3)- protegen de la apoptosis. Esta acción protectora del NO depende de la activación de la c-Src tirosina quinasa y del sistema de la sGC/PKG. Por último, hemos descrito que la activación de c-Src es un evento temprano en la señalización antiapoptótica que conduce a la activación del sistema PI3K/Akt/Bad. Nuestro grupo ha descrito también la implicación de las proteínas sustrato del receptor de la insulina (IRSs) en la señalización protectora del NO en la célula β . En dicha respuesta protectora participa la fosforilación de IRS-1, que también es dependiente de la activación de c-Src.

Se han descrito dianas adicionales del NO en otros sistemas celulares. Así, la vía Ras/Raf1/ Elk-1 se activa en linfocitos T en presencia de NO, lo que sugiere que este mensajero gaseoso puede participar en la regulación de una importante ruta señalizadora de proliferación. Por otro lado, se ha descrito en células endoteliales que la respuesta antiapoptótica iniciada por factores de crecimiento está ligada a la activación de Raf-1. Esta activación de Raf-1 desencadenada por el factor de crecimiento vascular (VEGF) está asociada a la fosforilación de sus residuos de tirosina 340 y 341 en un proceso dependiente de c-Src .

Dado que el cultivo en ausencia de suero conduce a la muerte por apoptosis de la célula β , es razonable proponer que la supervivencia y el crecimiento de la célula β esté modulado por factores tróficos extracelulares. Se había descrito previamente que el IGF-1 era capaz de bloquear la respuesta apoptótica inducida por citoquinas inflamatorias en la célula β . Por este motivo, nuestro grupo inició una serie de experimentos encaminados a estudiar el papel del NO en la señalización del sistema IGF-1/insulina. Nuestros resultados muestran que la retirada de suero provoca la apoptosis celular que se acompaña de un descenso en los niveles de la proteína eNOS/NOS3 y de la producción de NO. Estos efectos se cancelan sustancialmente tras la exposición de las células a insulina ó IGF-1. Además, los efectos protectores de la insulina/IGF-1 se cancelan en buena proporción con inhibidores de la NOS. La señalización por proteínas IRS está involucrada en las acciones antiapoptóticas de estos factores y la activación por fosforilación de estas proteínas es un proceso parcialmente dependiente de la activación de Src y del NO. El perfil de proteínas IRS de las células RIN muestra que ambas IRS-1 y 2 pueden estar involucradas en la transmisión de la señal antiapoptótica .

Queda por determinar el papel de las diferentes IRS en células β diferenciadas murinas y humanas. Por una parte, se ha descrito que la proteína IRS-2 juega un

papel relevante en el control de la masa de células β durante el desarrollo del páncreas en ratones . Por otro lado, los hallazgos de que la variante polimórfica Arg972 IRS-1 que es abundante en diabéticos tipo 2 causa apoptosis en islotes humanos in vitro, indican que esta IRS puede jugar un papel relevante en humanos. En este sentido, también son relevantes los estudios con una insulina modificada [LysB3, GluB29], que posee una acción protectora sobre la célula β asociada con una unión más fuerte al receptor .



La figura resume la red de acciones antiapoptóticas del NO que hemos descrito en la célula β pancreática.

Los procesos de apoptosis/supervivencia celular implican, además de la activación de vías de señalización intracelulares, la modificación de la transcripción de un cierto número de genes.

En este contexto, parece razonable plantear la hipótesis de que la expresión de un conjunto de genes antiapoptóticos estaría incrementada en respuesta a señales de supervivencia celular; la expresión de genes proapoptóticos estaría, por el contrario, disminuida.

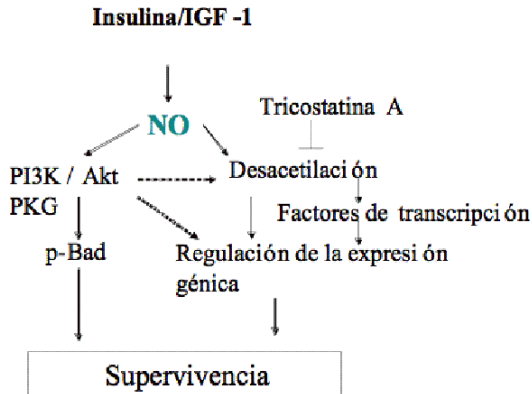
La función clásica de la acetilación de las histonas es la de permitir la descompactación de la cromatina como paso previo a la expresión de genes. Se ha mostrado recientemente que las histonas acetilasas (HAT) y las histonas desacetilasas (HDAC) actúan como coactivadores y correpresores respectivamente en la expresión y silenciamiento génico y que también juegan un papel importante en la acetilación de factores de transcripción. Así, la acetilación de los grupos β -amino de

residuos específicos de lisina de las histonas H3 y H4 están asociados con su neutralización y con la exposición de zonas promotoras de genes y el inicio de su transcripción. El reclutamiento de HAT a genes específicos depende de la interacción de factores de transcripción con sus secuencias específicas en las zonas potenciadoras (enhancers). Si bien quedan por definir los factores que permiten la unión de estos factores a sus enhancers, la acetilación de histonas forma parte de los procesos biológicos implicados en la regulación de la expresión de genes. Su relevancia biológica queda reflejada en el hecho de que el patrón de acetilación de las histonas está alterado en líneas tumorales y en cánceres en humanos. Por último, fármacos inhibidores de las HDAC están siendo evaluados en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer.

De hecho, hay una acetilación incrementada de las histonas H3 y H4 en células β cultivadas en medio carente de suero. Además, la acción protectora del NO se asocia con un descenso la acetilación de ambas histonas. Por otra parte, nuestro grupo ha encontrado que el incremento en la acetilación de histonas provocado por la Tricostatina A (inhibidor de las HDACs) está asociado con la puesta marcha del programa apoptótico en la célula β pancreática y con la expresión incrementada de proteínas proapoptóticas.

La regulación epigenética de la expresión de genes involucrados en la supervivencia y muerte de la célula β está siendo objeto de una creciente atención por varios grupos de investigación. Si bien queda por establecer el papel de la acetilación de proteínas histonas y no histonas en la señalización protectora de Insulina/IGF-1 en células secretoras de insulina, tiene relevancia el hallazgo de que el programa de supervivencia en el gusano *C. Elegans* dependiente la insulina/IGF-1 implica a una proteína desacetilasa dependiente de NAD (Sir-2). La posible implicación de las HATs/HDACs en el control de la expresión de “diabetogenes” durante la patogénesis de la diabetes ha sido propuesta recientemente en una extensa revisión sobre el tema así como la posible utilidad como diana terapéutica en el tratamiento farmacológico de la diabetes.

Papel de la Desacetilación de Histonas en la Expresión de Genes de Supervivencia en la Célula ?



Ya que el NO juega un papel relevante en la regulación de la supervivencia y muerte de la célula β pancreática, entendemos que puede formar parte de la señalización protectora desencadenada por factores del tipo de la insulina, el IGF-1, el GLP-1, y de su agonista la exendina, etc. Esta hipótesis se apoya además en la acción estimuladora de la insulina sobre la producción de NO en células endoteliales. El islote de Langerhans es una estructura muy vascularizada y el flujo sanguíneo está controlado por nutrientes como la glucosa y por factores tróficos. Es posible que el NO generado localmente por las células endoteliales ejerza efectos tróficos sobre las células endocrinas del islote. Alternativamente, la especificidad de las acciones tróficas del NO sobre la célula β pancreática dependería de la síntesis de este mediador gaseoso en la propia célula en un proceso desencadenado por la interacción de factores tróficos con sus receptores específicos. Dado que la célula β del páncreas tiene receptores para la insulina y responde al IGF-1, así como a incretinas como GLP-1 y al propio glucagón, es factible que alguno de estos factores participe en la regulación de la producción endógena de NO. Resulta especialmente atractiva la idea de que la insulina tenga alguna acción sobre la propia célula que la produce. El posible papel autocrino de la insulina ha sido estudiado a lo largo de los años con resultados conflictivos. La evidencia experimental indica que la insulina no regula de manera determinante su secreción. Sin embargo, la anulación del gen para la proteína sustrato para el receptor de la insulina IRS-2 en este

tipo celular conlleva a un desarrollo defectuoso del páncreas endocrino y a la diabetes en ratones. Este hallazgo muestra que esta vía de señalización intracelular juega un papel relevante durante la organogénesis del páncreas y que su puesta en marcha por factores como el IGF-1 pudiera ser relevante durante el período del desarrollo embrionario y fetal. Esta vía de señalización pudiera jugar también un papel en la vida adulta, interviniendo en el control de la regeneración de la masa celular y en la generación de factores de supervivencia antiapoptóticos que permiten al páncreas modular su masa en respuesta a demandas sostenidas del organismo y hacer frente a situaciones de amenaza como el estrés metabólico/ oxidativo y el ataque de la inmunidad adquirida/natural. Un fallo en este sistema de protección pudiera estar involucrado en la génesis de ambas formas de diabetes, bien por condicionamientos genéticos, bien por su capacidad limitada para hacer frente a estímulos lesivos o bien por una disfunción provocada por el propio proceso que destruye a la célula β . En este sentido, es interesante pensar que las citoquinas inflamatorias bloqueen la señalización a través de esta ruta de supervivencia en la patogénesis de ambas formas de diabetes en humanos.

Bibliografía seleccionada

1. Mabley JG, Belin V, John N, Green IC. Insulin-Like Growth factor I reverses interleukin-1 β inhibition of insulin secretion, induction of nitric oxide synthase and cytokine-mediated apoptosis in rat islet of Langerhans. *FEBS Letters*; 1997; 417:235-238
2. Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, King GL. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulation*. 2000; 101: 676-681
3. Federici M, Hribal ML, Ranalli M, Marselli L, Porzio O, Lator D, Borboni P, Lauro R, Marchetti P, Melino G, Sesti G: The common Arg 972 polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes apoptosis of human pancreatic islets. *FASEB J*. 2000; 15:22-24
4. Burks DJ, White MF. IRS proteins and beta-cell function. *Diabetes* 2001;50 Suppl 1:S140-5
5. Rakatzi I, Seipke G, Eckel J: [LysB3, GluB29] insulin: a novel insulin analog with enhanced β -cell protective action. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 310: 852-859
6. Tejedo JR, Cahuana GM, Ramírez R Esbert M, Jiménez J, Sobrino F, Bedoya FJ. Nitric Oxide Triggers the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Survival Pathway in Insulin-Producing RINm5F cells by arousing Src to activate Insulin Receptor Substrate 1. *Endocrinology* 2004; 145: 2319-2327
7. Brubaker PL, Drucker DL. Minireview. Glucagon-like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and the central nervous system. *Endocrinology* 2004; 145: 2653-2659
8. Dickson LM, Rhodes, CJ. Pancreatic β -cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E192-E198
9. Katic M, Kahn C R. The role of insulin and IGF-1 signaling in longevity. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005; 62 : 320-343
10. Gray SG, De Meyts, P. Role of histone and transcription factor acetylation in diabetes pathogenesis. *Diabetes Metab Res Rev* 2005; 21: 416-433
11. Porcu M, Chiarugi, M. The emerging therapeutic potential of sirtuin-interacting drugs: from cell death to lifespan extension. *TIPS*. 2005; 26: 94-103

CAPÍTULO 5

Amilina y Toxicidad Beta Pancreática

AUTORES

Anna Novials Sardà*
Sílvia Casas Fontdevila**

*Endocrinóloga. Investigadora básica. Fundació Sardà Farriol

**Investigadora básica. Fundació Sardà Farriol

1. Amiloide pancreático

Amiloidosis engloba un grupo de entidades clínicas caracterizadas por el depósito extracelular de proteínas de estructura fibrilar en órganos y tejidos. Algunas formas de amiloidosis fueron consideradas como un fenómeno inespecífico asociado al proceso de envejecimiento. No obstante, el aumento de la longevidad y la mejor definición clínica de las enfermedades crónicas han demostrado que el depósito de amiloide puede ser específico para determinadas enfermedades, como son las placas de amiloide en el tejido nervioso de la enfermedad de Alzheimer o el amiloide pancreático en la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). El término amiloide fue introducido por Virchow en 1853, basándose en las propiedades tintoriales de los depósitos amorfos en las secciones histológicas: los órganos infiltrados adquirirían coloración negruzca al ser tratados con yodo, de forma análoga al almidón (del griego amylos, almidón).

A pesar que cada tipo de amiloidosis se caracteriza por la agregación y deposición de una proteína fibrilar específica, los depósitos de sustancia amiloide comparten características histoquímicas y una morfología estructural parecida. En primer lugar, durante el proceso de formación, aparecen oligómeros solubles del componente proteico, los cuales pasan a adoptar una estructura secundaria en conformación beta, lo que significa que las cadenas polipeptídicas están dispuestas en láminas plegadas, unidas transversalmente mediante enlaces de hidrogeno intercatenarios. La presencia de una estructura cuaternaria se muestra con un aspecto típico al microscopio electrónico, en la que la sustancia amiloide está constituida por agregados fibrilares rígidos, lineares no ramificados, de 7-10 nm de diámetro y de longitud variable. Todos los depósitos de amiloide, independientemente de la proteína específica formadora de fibras, contienen proteínas comunes, como la glucoproteína denominada SAP (serum amyloid P component), los componentes del complemento C1q y C3, la apoproteína E y los proteoglicanos del tipo heparán sulfato.

La presencia de depósitos de sustancia amiloide en los islotes pancreáticos es una característica fisiopatológica en la diabetes mellitus tipo 2, que se ha descrito en mas del 90% de las necropsias de los pacientes afectados de dicha enfermedad. Estos depósitos fueron originalmente descritos por Opie en 1900, pero debido a su elevada insolubilidad que dificultaba el análisis de los compuestos químicos, se pensó erróneamente que consistían en depósitos de insulina. Fue en 1986 cuando Westermarck et al. (1) aislaron el principal componente proteico a partir de un insu-

linoma pancreático, siendo purificado y secuenciado parcialmente. En 1987, Cooper et al. (2) identificaron un péptido idéntico en extractos de tejido pancreático rico en amiloide procedente de pacientes diabéticos. Se trataba de una proteína de 37 aminoácidos, sintetizada y secretada por las células beta pancreáticas, llamada amilina o IAPP (islet amyloid polypeptide).

2. Amilina: síntesis, secreción y funciones biológicas

La amilina presenta homología estructural del 43 y 46%, respectivamente, con los neuropéptidos CALCA y CALCB (calcitonin gene-related polypeptides), sintetizados por las células C de la glándula tiroides. Los tres péptidos tienen longitud idéntica, residuos de cisteína en la posición 2 y 7, y presentan dos modificaciones postraduccionales homólogas (amidación del residuo carboxiterminal y un puente disulfuro intramolecular). Más del 80% de la secuencia de la amilina presenta un alto grado de conservación entre diferentes especies de mamíferos, lo que sugiere puede tener una significativa función biológica.

La amilina es sintetizada en la célula beta a partir de un precursor proteico de 89 aminoácidos, la preproamilina. En el retículo endoplasmático se realiza la escisión proteolítica de la secuencia de 22 aminoácidos del péptido señal, liberándose la proamilina de 67 aminoácidos. Las modificaciones postraduccionales para formar la amilina madura incluyen pérdida de los propéptidos aminoterminal (11 aminoácidos) y carboxiterminal (19 aminoácidos) por enzimas proteasas convertasas (NEC2 y NEC1/3) responsables también del procesamiento de la proinsulina. En el extremo carboxiterminal, la señal dibásica está procedida de una glicina, lo que permite la amidación de la tirosina en la posición 37 de la amilina madura. Modificaciones adicionales incluyen la formación de un puente disulfuro entre los residuos 2 y 7 de cisteína.

La amilina se localiza juntamente con la insulina en los gránulos secretores de las células beta pancreáticas. Existen evidencias en humanos de que se secreta juntamente con la insulina en condiciones basales y en respuesta tanto a la glucosa como a diferentes estímulos secretagogos. Experimentos in vitro con islotes humanos aislados han demostrado que la regulación del gen de amilina depende de las concentraciones de glucosa y de las señales derivadas de su metabolismo de una forma similar al gen

de la insulina (3,4). En la mayoría de condiciones, los cambios de secreción de la amilina se producen de forma paralela a los cambios en la secreción de insulina, constituyendo aproximadamente una relación equimolar entre 1/20 y 1/50. Entre sus acciones biológicas para algunas de las cuales se han descrito receptores específicos, destaca la inhibición de la secreción de glucagon, el estímulo sobre el eje renina-angiotensina, el retraso del vaciamiento gástrico, y la inhibición sobre los centros hipotalámicos reguladores del apetito. Algunas de estas acciones se están estudiando como tratamiento coadyuvante de la insulina para ciertos casos de diabetes.

3 Factores determinantes para la formación del depósito de amiloide en la DM2

A pesar de que más del 80% de la secuencia de la amilina presenta un alto grado de conservación entre diferentes especies de mamíferos, únicamente humanos, primates y gatos expresan una forma de amilina capaz de formar depósitos de sustancia amiloide. Los residuos 20-29, localizados en el centro de la secuencia de aminoácidos de la amilina, presentan un mayor grado de variabilidad entre especies, y son críticos para la formación de la estructura secundaria beta. En esta región, tres residuos de prolina están presentes en la amilina de rata y ratón. Puesto que la prolina inhibe el cambio a conformación beta, la presencia de tres residuos de prolina en esta región crítica de la amilina prevendría de la formación de láminas beta plegadas necesarias para la creación de fibras amiloides y explicaría la ausencia de amiloidosis pancreática en roedores. Esta hipótesis ha sido demostrada en experimentos donde se substituyen aminoácidos en la región 20-29 de la amilina humana, viéndose modificadas las propiedades amiloidogénicas del péptido. En este sentido, se iniciaron estudios genéticos poblacionales en busca de mutaciones en el gen de la amilina que pudieran dar origen a cambios críticos en la secuencia del péptido, y que pudieran explicar la presencia de depósitos de amiloide en individuos diabéticos. La mutación S20G fue descrita en población japonesa en el 4% de pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Estudios in vitro confirmaron que, la substitución de serina en la posición 20 por glicina de la molécula de amilina mutada, otorga mayor potencial amiloidogénico. No obstante, esta mutación no ha sido detectada en otras poblaciones estudiadas de origen caucásico.

La presencia de depósitos de amiloide es excepcional en individuos sanos no diabéti-

cos. Por tanto, la secuencia crítica amiloidogénica de la amilina es necesaria, pero no suficiente, para la formación de tales depósitos en los islotes pancreáticos de pacientes con DM2. En consecuencia, otros factores estarían involucrados en el proceso de amiloidogénesis para explicar la frecuente asociación entre amiloide y DM2.

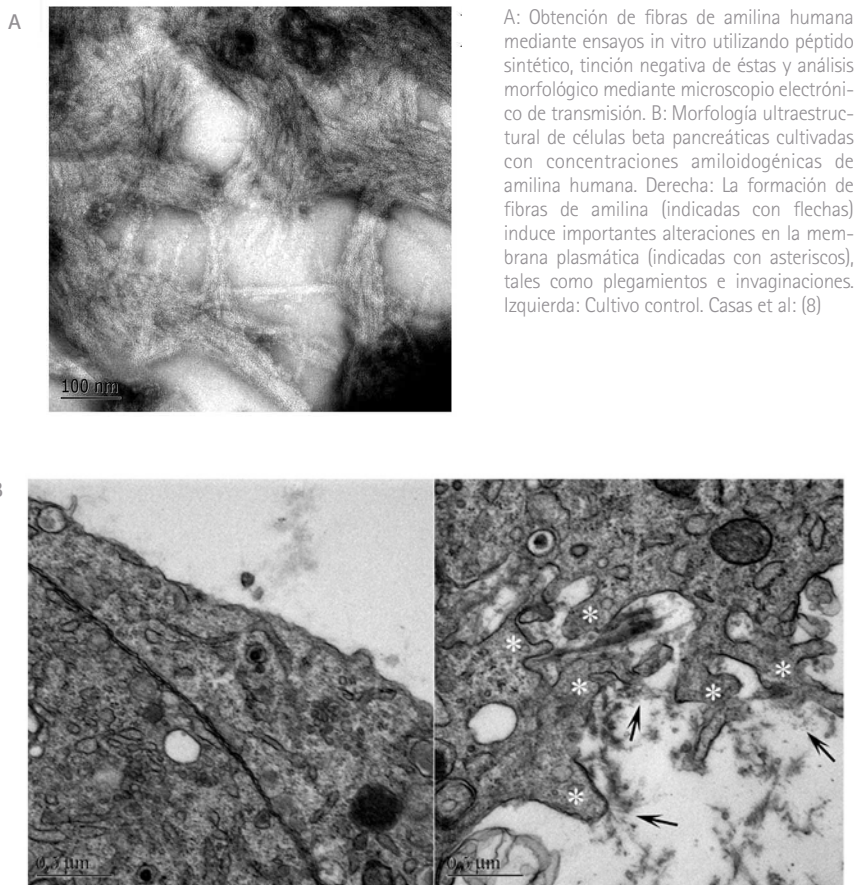
En condiciones fisiológicas, la amilina no forma fibras de amiloide, sugiriendo que deben existir mecanismos en la célula beta pancreática que mantengan la estructura nativa de la amilina. El nivel de pH y la concentración de calcio están altamente controlados en el gránulo de secreción para permitir el correcto tráfico y maduración de la insulina y amilina. Alteraciones en ambos parámetros se han relacionado con anomalías en el proceso de formación de amiloide. Parece que un ambiente normal dentro del gránulo de secreción mantiene la amilina en forma soluble no fibrilar. Asimismo, estudios *in vitro* sugieren que una proporción molar normal entre amilina e insulina, proinsulina o péptido C protegería de la formación de fibras de amiloide, puesto que insulina y amilina pueden formar complejos estables que impiden el cambio a conformación beta. Alteraciones en cualquiera de estos componentes del gránulo de secreción, que bien se puede dar en una situación de disfunción de la célula beta pancreática, podrían contribuir a la formación de fibras de amiloide.

La DM2 está asociada a niveles elevados de glucosa y ácidos grasos libres, condiciones que pueden contribuir a la formación de depósitos de amiloide. La hiperglucemia crónica en combinación con el estrés oxidativo da lugar a la formación de AGEs (advanced glycation end products). Existen evidencias de glicosilación de amilina por AGEs en la diabetes, así como que la amilina glicosilada tiene mas potencial amilogogénico que el péptido no modificado. Situaciones en que la disfunción de la célula beta provoca una secreción elevada de proinsulina, es decir que se incrementa el ratio proinsulina respecto a insulina, es un hecho observado en la diabetes, y en individuos con riesgo de padecer la enfermedad. Dado que proamilina es procesada por las mismas proteasas que la insulina, se postula que la disfunción de la célula beta provocaría una alteración en el procesamiento de la amilina, que conduciría a su precipitación y acumulo en el espacio pericapilar.

Se ha propuesto que la sobre-expresión de amilina podría conducir también a la acumulación y agregación del péptido. Ensayos *in vitro* utilizando amilina sintética muestran que es posible generar fibras de amilina espontáneamente, y que éste proceso depende mayoritariamente de la concentración inicial de péptido (figura 1). La expresión de amilina en modelos celulares mediante promotores potentes, como

FIGURA 1

Morfología de los depósitos de amiloide pancreáticos



promotores víricos, han reproducido la formación de depósitos de amiloide. Existen también diversos modelos de animales transgénicos para la amilina humana dónde se han detectado depósitos de amiloide. En humanos, en una situación de actividad excesiva de la célula beta, es posible observar la formación de depósitos de amiloide, siendo el ejemplo más demostrativo el amiloide asociado a insulinomas. También se ha documentado abundante amiloide insular en pacientes con hiperpla-

sia de islotes pancreáticos. Por otro lado, existe el caso de los pacientes no diabéticos con insuficiencia renal terminal, en los que junto a elevadas concentraciones de amilina se ha descrito una mayor prevalencia de amiloide pancreático en relación con sujetos no diabéticos y sin insuficiencia renal.

Estudios realizados por nuestro grupo de investigación en población diabética han detectado en la región promotora del gen de la amilina la presencia de una mutación, consistente en la substitución guanina por alanina, en la posición -132 bp del punto de inicio de transcripción (5)(figura 2). Dicha mutación presenta una frecuencia significativamente superior en población diabética en relación con la población control (10.1% vs. 0.9%). Asimismo, los niveles de amilina en los individuos portadores eran significativamente superiores a los de los individuos diabéticos no portadores. Estudios in vitro han demostrado que dicha mutación causa un incremento de la actividad transcripcional del gen (6), capaz de producir una sobreexpresión de la amilina, sugiriendo que podría desempeñar un papel potencial en la formación de depósitos de amiloide.

FIGURA 2

Análisis de la mutación -132 G/A de la región del promotor del gen de amilina.

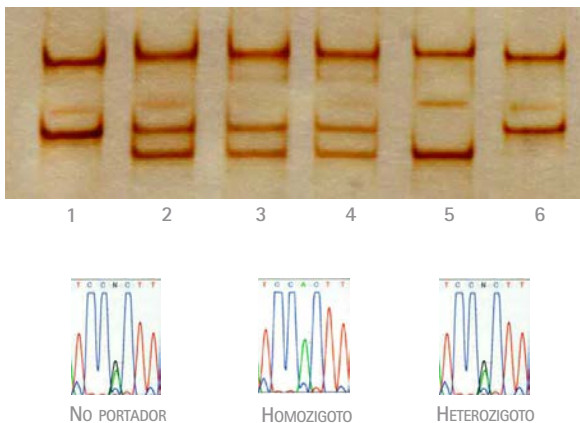


Figura 2. Análisis de la mutación -132 G/A de la región del promotor del gen de amilina. A: Detección de distintos patrones de migración del ADN genómico de pacientes con DM2, mediante técnica de SSCP. Carriles 1 y 6, patrón normal. Carriles 2,3 y 4 patrón heterocigoto. Carril 5, patrón homocigoto. B: Secuenciación de ADN de las muestras anteriores donde se detecta el punto mutado de cambio de base guanina por adenina. En las muestras heterocigotas se detectan dos picos superpuestos que representan los dos alelos distintos de ADN. Novials et al (5)

No existe todavía un claro consenso en relación al lugar donde se inicia la formación de amiloide. Las necropsias de páncreas diabéticos humanos, de gato, o de primates no humanos indican la formación de los depósitos siempre extracelulares a la célula beta pancreática y cerca de los capilares. Sólo en modelos de sobreexpresión de amilina, tales como animales transgénicos, líneas celulares expresando amilina humana mediante promotores génicos potentes, o en insulinomas humanos, se ha detectado depósitos de amiloide dentro de la célula beta pancreática.

4. Citotoxicidad de la amilina

Actualmente se considera que la asociación entre formación de amiloide y citotoxicidad es común para la mayoría de amiloidosis, y se produce por inducción de apoptosis. La formación de depósitos de amiloide en los islotes pancreáticos se caracteriza in vivo por presentar una reducción del 40 al 50% de masa celular beta pancreática en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Estudios con animales transgénicos o líneas celulares expresando amilina humana han demostrado su capacidad citotóxica. Asimismo, varios estudios in vitro muestran que la citotoxicidad por amilina humana es concentración-dependiente para varios tipos celulares, incluidas las células beta pancreáticas. Sin embargo, existen aun varios puntos críticos que están por clarificar. Por ejemplo, cabe preguntarse ¿cual es el estado de agregación y conformación de la amilina citotóxica? así como ¿cual es el mecanismo detallado de inducción de apoptosis?

Los primeros estudios dirigidos a investigar los mecanismos de citotoxicidad por amilina en islotes pancreáticos humanos fueron realizados por Lorenzo et al. (7), y demostraron una correlación directa entre muerte celular por apoptosis y presencia de fibras insolubles de amilina humana en contacto con los islotes. Se demostró también que los agregados solubles de amilina humana no eran tóxicos, ni tampoco amilina de rata que no es capaz de formar fibras insolubles. La citotoxicidad de amilina humana fue confirmada en varias líneas celulares neuronales y pancreáticas, tratadas con elevadas dosis del péptido en forma insoluble, aportando evidencias adicionales de la apoptosis como el proceso responsable de muerte celular. Por otra parte, estudios in vitro identificaron alteraciones en la expresión de varios genes relacionados con vías específicas

de inducción apoptótica. Se ha asociado citotoxicidad de la amilina humana con formación de ROS (reactive oxygen species). De hecho, han sido descritos marcadores de estrés oxidativo en células tratadas con amilina humana. Otra característica de la citotoxicidad de la amilina humana es la inducción de alteraciones en los niveles intracelulares de calcio, documentada en estudios *in vitro* en varios modelos celulares. Resultados preliminares obtenidos por nuestro grupo de investigación muestran que alteraciones en la homeostasis intracelular del calcio son críticas para la viabilidad de la célula beta pancreática. Tales alteraciones conllevan a la aparición de estrés de retículo endoplasmático, que a su vez influirán sobre la cascada de señalización de apoptosis (8).

En las necropsias de páncreas diabéticos humanos y de animales transgénicos se observan alteraciones morfológicas en la membrana plasmática de las células beta pancreáticas en contacto con los depósitos de amiloide extracelulares. Lorenzo et al. (7) demostraron que para detectar citotoxicidad por amilina humana era necesario el contacto de las fibras insolubles con los islotes. Para el estudio de las interacciones de la amilina humana con la membrana celular plasmática se han utilizado, en la mayoría de los trabajos, membranas fosfolípicas artificiales. Mirzavecov et al. (9) demostraron que concentraciones citotóxicas de amilina humana causaban un incremento de la conductancia a través de la membrana celular, sugiriendo como posible mecanismo de acción, la formación de canales permeables a iones. Se obtuvieron resultados similares con concentraciones citotóxicas del péptido amiloide de Alzheimer pero no con amilina de rata. Estos hallazgos corroboran la especificidad de la molécula humana para desarrollar fibras tóxicas. Por otro lado, el grupo de Janson et al. (10) evidenciaron diferencias en la capacidad de elevar la conductancia de membrana al tratar *in vitro* con concentraciones de amilina humana recién disuelta versus administración de fibras de amilina maduras. A partir de estos trabajos surgió la hipótesis de que durante la formación de fibras de amilina, aparecen oligómeros solubles de amilina, especies transitorias con conformación diferente al monómero original, y que serían desde el punto de vista citotóxico, más agresivas que las fibras de amilina maduras. Ésta capacidad sería compartida por otros péptidos amiloides, tales como Ab, pero se propone como mecanismo el incremento de la permeabilidad de membrana, independiente a la formación de canales iónicos o a la disrupción de la integridad de la membrana plasmática. En la actualidad, éste es un campo interesante de investigación en pleno desarrollo.

5. Depósito de amiloide y DM2: ¿un componente precoz o tardío?

¿Cuál sería la relación entre amiloide pancreático y la patogenia de la DM2?, ¿Podemos establecer realmente si el fenómeno de amiloidogénesis es una complicación de la diabetes o se trata de un efecto casual? Desafortunadamente, la relación entre amiloide, diabetes, resistencia a la insulina y disfunción de la célula beta, es muy difícil de establecer in vivo, y no existen marcadores clínicos que puedan cuantificar el proceso, debido en parte a que las biopsias pancreáticas son éticamente inaceptables. Estudios longitudinales en monos muestran la aparición de depósitos de amiloide antes del desarrollo de la diabetes. En cambio, en pacientes diabéticos de larga evolución, en el análisis de las autopsias de páncreas el grado de amiloidosis puede ser muy variable, desde tan solo un 1% de los islotes con pequeños cúmulos perivascular, hasta un 90% de afectación con grandes cúmulos que desplazan y destruyen las células insulares. De estos hallazgos podemos deducir que el papel del amiloide en el inicio y progresión de la diabetes en el hombre es extremadamente complejo y se requiere más amplios estudios para determinar su importancia etiopatogénica.

La creación de animales transgénicos proporcionó la oportunidad de estudiar el efecto de un factor determinado en una enfermedad multifactorial como es la diabetes. Los ratones transgénicos heterocigotos iniciales que sobreexpresaban la amilina humana no fueron capaces de formar depósitos de amiloide, pero si en ciertos casos en ratones homocigotos. Estos hallazgos indican que la citotoxicidad de la célula beta inducida por el transgén depende de los valores de expresión del gen. Incrementos en la incidencia de aparición de amiloide se consiguió al tratar los animales transgénicos con hormonas de crecimiento y dexametasona para inducir resistencia a insulina, o al cruzarlos con animales modelos genéticos de obesidad (mutantes para los genes *Agrp* o *leptina*). En los animales transgénicos para amilina humana y *ob/ob*, el grado de amiloidosis se correlacionó significativamente con la severidad de diabetes. Mediante el estudio de los diferentes animales transgénicos se propuso que los depósitos de amiloide eran tanto causa como consecuencia de la DM2. Así, los depósitos de amiloide podrían ser una consecuencia de la sobreproducción de amilina que acompaña a la sobreproducción de insulina, y a continuación, contribuirían a la degeneración y pérdida de masa celular beta del islote.

6. Conclusiones

El papel de la amilina sigue siendo enigmático, a pesar que hace ya más de un siglo que se conoce su implicación en la diabetes. La complejidad de este pequeño péptido pancreático lo ha hecho muy atractivo para un gran número de científicos que siguen investigando a nivel molecular el proceso de amiloidogénesis, así como la forma de revertir la formación de fibras de amilina. La síntesis de nuevos fármacos que inhiban la formación de fibras de amiloide podrá representar una nueva opción terapéutica para la DM 2.

7. Bibliografía seleccionada

1. Westermark P, Wernstedt C, Wilander E, Hyden DW, O'Brien TD, Johnson KH. Amyloid fibrils in human insulinoma and islets of Langerhans of the diabetic cat are derived from a neuropeptide-like protein also present in normal islet cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3881-3885, 1987.

2. Cooper GJ, Willis AC, Clark A, Turner RC, Sim RB, Reid KB. Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:8628-8632, 1987.

3. Novials A, Sarri Y, Casamitjana R, Rivera R, Gomis R. Regulation of islet amyloid polypeptide in human pancreatic islets. *Diabetes* 42: 1514-1519, 1993

4. Gasa R, Gomis R, Casamitjana R, Rivera F, Novials A: Glucose regulation of islet amyloid polypeptide gene expression in rat pancreatic islets. *Am J Physiol* 272: E543-E549, 1997

5. Novials A, Rojas I, Casamitjana R, Usac EF, Gomis R. A novel mutation in islet amyloid polypeptide (IAPP) gene promoter is associated with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 44:1064-1065, 2001.

6. Novials A, Mato E, Lucas M, Franco C, Rivas M, Santiesteban P, Gomis R: Mutation at position -132 in the islet amyloid polypeptide (IAPP) gene promoter enhances basal transcriptional activity through a new CRE-like binding site. *Diabetologia* 47:1167-1174, 2004.

7. Lorenzo A, Razzaboni B, Weir GC, Yankner BA. Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature* 368:756-760, 1994.

8. Casas S, Gomis R, Gribble FM, Altirriba J, Knuutila S, Novials A. Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway is a downstream ER stress response induced by extracellular human islet amyloid polypeptide and contributes to pancreatic β -cell apoptosis. *Diabetes* 56: 2284-2294, 2007

9. Mirzabekov T, Lin MC, Yuan WL, Marshall PJ, Carman M, Tomaselli K, Lieberburg I, Kagan BL. Channel formation in planar lipid bilayers by a neurotoxic fragment of the beta-amyloid peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 202:1142-1148, 1994.

10. Janson J, Ashley RH, Harrison D, McIntyre S, Butler PC. The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes* 48:491-498, 1999.

CAPÍTULO 6

Las incretinas en la secreción de insulina

AUTORES

Jesús Cancelas Navia
Verónica Sancho Bórnez
Isabel Valverde Alonso
María L. Villanueva-Peñacarrillo
Molina

Dpto. Metabolismo, Nutrición y Hormonas.
Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

La ingestión de alimentos induce la activación de múltiples respuestas fisiológicas que proporcionan señales neuronales y endocrinas, reguladoras de la digestión, absorción y asimilación de los nutrientes ingeridos. En cierto momento se observó que, en sujetos normales, los niveles de insulina circulante en respuesta a la administración oral de glucosa eran significativamente mas altos que los correspondientes tras la administración intravenosa del azúcar, y esta potenciación de la secreción de insulina asociada al intestino fue atribuida a uno o varios factores humorales o neuronales que se dieron en llamar incretinas. El termino incretina, por tanto, corresponde a aquellos factores liberados por el intestino tras la absorción de glucosa y otros nutrientes, que actúan directamente en el páncreas estimulando su secreción endocrina, concretamente la de insulina. Por ello, el concepto incretina esta muy relacionado con el eje entero-insular propuesto por Unger y Eisentraut en 1969, el cual comprende a todos aquellos estímulos que, partiendo del intestino delgado, inciden por distintas vías, incluida la nerviosa, en el islote de Langerhans, afectando a la liberación de sus distintas hormonas. El inicio de la identificación de factores incretina no tuvo lugar hasta 1970, momento en el que se purificó y caracterizó el primero de ellos, el GIP (glucose-dependent insulinitropic polypeptide). Pero aunque el GIP mostró ser un potente estimulador de la secreción de insulina tras la administración oral de glucosa, la eliminación del GIP por inmunoabsorción en la rata no anulaba el efecto incretina. Ello evidenciaba la existencia de otros factores con dicha actividad; de hecho, años después, en el transcurso del proceso de clonaje y caracterización del gen del proglucagón, se identificó un segundo factor, el GLP-1 (glucagon like peptide-1).

El GIP es un péptido con 42 aminoácidos, que se produce predominantemente en las células K del duodeno, en el extremo proximal del intestino delgado, aunque también se localiza en el sistema nervioso central, donde participa en el control de la supervivencia celular. El estímulo más importante para su secreción son los nutrientes, de forma que en el ayuno sus niveles permanecen bajos, y aumentan en pocos minutos tras la comida. La molécula de GIP contiene una alanina en la posición 2, que lo convierte en un sustrato idóneo de enzima esencial en la regulación del proceso de degradación no sólo del GIP sino también del GLP-1, la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4).

Los efectos del GIP están mediados por un receptor específico del que existen dos isoformas, una de 466 aminoácidos y otra de 493, que se expresan en célula β pancreática, tejido adiposo, corazón y cerebro. Aunque se ha observado que ambos

receptores, el de GIP y el de GLP-1, sufren *in vitro* una rápida y reversible desensibilización homóloga y heteróloga, *in vivo* ésta sólo se detecta en el del GIP; no se ha encontrado relación entre los genes que codifican para ambos receptores y la posible susceptibilidad genética a padecer diabetes.

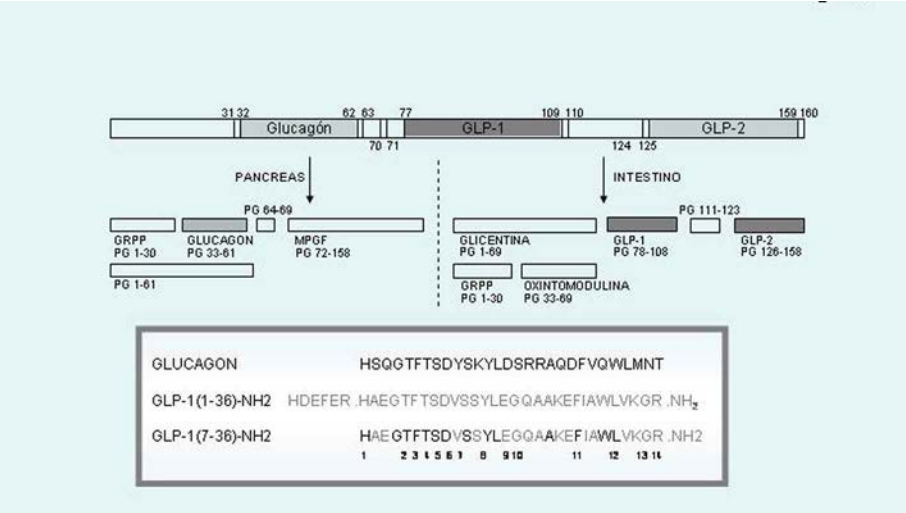
Ambos, el GIP y el GLP-1, estimulan la secreción de insulina de forma dependiente a la glucosa, por activación de una proteína G específica acoplada al receptor que se expresa directamente en la célula β . El mecanismo por el cual ambas incretinas activan la secreción de insulina sólo a altas concentraciones de glucosa, se desconoce por el momento, pero su efecto está acoplado a la adenilato ciclasa, a un incremento del $[Ca^{2+}]_i$ y al flujo de ácido araquidónico, y en su acción se activan rutas dependientes de factores de crecimiento como la de las MAPKs (ERK 1 y 2), la PI3K o la PKB (AKT). El GIP, además de insulínotropico, muestra cierta acción proliferativa y antiapoptótica en la célula β del islote, y mejora la supervivencia de células INS-1 de rata expuestas a wortmanina o estreptozotocina (STZ). Esta acción antiapoptótica del GIP está asociada a una reducción de la activación de caspasa 3 y es dependiente de la ruta p38MAPK. Así mismo, el GIP mejora la supervivencia de células INS-1 (832/13), sujetas a glucolipotoxicidad, y de islotes murinos, vía retroinhibición de la transcripción de un gen pro-apoptótico como Bax, y a través de una reducción de la expresión nuclear del factor transcripcional Foxo-1. Dos semanas de infusión de GIP retroinhiben Bax e incrementan la expresión de Bcl2 en célula β del páncreas de ratas obesas ZDF –Zucker diabetic fatty–. Aunque la acción insulínopéptica del GIP está disminuida en roedores hiperglucémicos, en parte debido a una disminución de la expresión de su receptor, se desconocen los factores implicados en el desarrollo de diabetes, y si los efectos del péptido sobre el crecimiento y supervivencia celular pueden estar afectados.

El GLP-1 se produce en las células enteroendocrinas de la región distal del intestino delgado y en el colon; sus niveles aumentan en escasos minutos tras la ingestión de nutrientes, y parece que tanto factores neuronales como endocrinos promueven su secreción mucho antes de que los nutrientes atraviesen la pared intestinal y entren en contacto directo con las células L enteroendocrinas, responsables de su liberación. Aunque el GIP estimula la secreción de GLP-1 en algunas especies, se desconoce la totalidad de factores que participan en la liberación del péptido en el hombre.

La molécula del proglucagón humano, deducida de la de los nucleótidos del gen, y

también la de otros mamíferos, tiene 180 aminoácidos, veinte de los cuales forman el péptido señal, y el resto, la prohormona. Pero la cualidad de los péptidos originados del proglucagón depende del tejido de traducción, páncreas o intestino. En las células α pancreáticas, se produce, predominantemente, el fragmento 1-30, llamado también, GRPP o péptido pancreático relacionado con la glicentina, el 33-61 o glucagón, el 64-69, el 1-61, y la porción carboxi-terminal 72-158, denominada MPGF (Major Proglucagon Fragment). En las células L del intestino, del proglucagón se origina, fundamentalmente, la fracción 1-69, llamada glicentina, la 33-69 u oxintomodulina, el GLP-1, proglucagón 78-108 o proglucagón 78-107amida, y el GLP-2 o proglucagón 126-158. La glicentina y la oxintomodulina corresponden a las fracciones I y II, respectivamente, del GLI (glucagon-like immunoreactivity) de extractos de intestino, que se liberan tras la administración, exclusivamente oral, de glucosa. Por otro lado, tanto en las células α del páncreas como en las L enteroendocrinas, se expresa el factor de transcripción *cdx 2/3*, que se encarga de la regulación del gen del proglucagón. En el intestino, el origen del GLP-1 parece estar condicionado a la expresión específica de tejido de las convertasas de prohormonas (PCs) en las células enteroendocrinas; mientras que tanto la PC1 como la PC2 escinden el proglucagón para generar MPGF, glicentina y oxintomodulina, sólo la PC1 parece ser la enzima responsable de la producción de GLP-1 y GLP-2.

FIGURA 1



Proceso postraduccional de la molécula de proglucagón. Origen y localización de péptidos glucagon-like.

De todos los productos posibles de glucagon-like-peptide-1, el GLP-1 es la forma predominante en el intestino de varios mamíferos, incluido el hombre, en los que su secuencia de aminoácidos no sólo es idéntica, sino coincidente con la del glucagón en la posición de catorce de ellos. Además, el GLP-1 es el mayoritario en el plasma, tanto en condiciones basales como en el incremento observado tras una comida mixta o sobrecarga oral de glucosa. También, el aumento de inmunorreactividad al perfundir intraluminalmente glucosa en el íleon del cerdo y del perro se debe al GLP-1, cuya secreción aumenta tras la ingestión o infusión intraduodenal de grasas en el hombre y en el cerdo, respectivamente. Sin embargo, la información relativa a los niveles basales del GLP-1 en plasma, tanto en condiciones normales como en estados que cursan con alteraciones del metabolismo de la glucosa, ha sido, por lo general, y durante bastante tiempo, controvertida; de hecho, mientras que algunos autores describían niveles plasmáticos significativamente más altos en pacientes diabéticos no dependientes de insulina que en sujetos sanos, otros decían ser más bajos. Últimamente, los resultados parecen más sólidos, e indican que en pacientes diabéticos tipo 2, y también en tipo 1, hay una menor liberación de GLP-1 que podría estar justificada por una ulterior desensitización de la célula L. Por otro lado, algunos afirman que la respuesta del péptido a estímulos está disminuida en los obesos.

En 1987 se documentó por primera vez la capacidad del GLP-1 para estimular la liberación de insulina, tras ser perfundido en el páncreas del cerdo, y también en infusión intravenosa en el hombre. Trabajos posteriores ampliaron la confirmación de este efecto –a concentraciones fisiológicas– en el páncreas aislado y perfundido del perro y de la rata, y en el islote aislado de ratón, así como su acción dependiente de la concentración de glucosa, tanto in vitro como in vivo. Además, se supo que el GLP-1 estimula la transcripción del gen de la insulina, que induce su acumulación en los gránulos secretores de células de líneas tumorales pancreáticas, que propicia la proliferación de las células β y la neogénesis del islote pancreático, con lo que su acción no extenúa la capacidad de la célula; además, su efecto insulínotrópico es más potente que el del GIP, si bien ambos participan en el efecto incretina. En 1992, se documentó por primera vez un efecto antidiabético del GLP-1 independiente de los niveles de insulina circulante, tanto en sujetos normales como diabéticos.

A lo anterior, hay que añadir su posible acción beneficiosa en relación a la secreción de insulina en la diabetes tipo 2, donde la célula β parece sufrir de una espe-

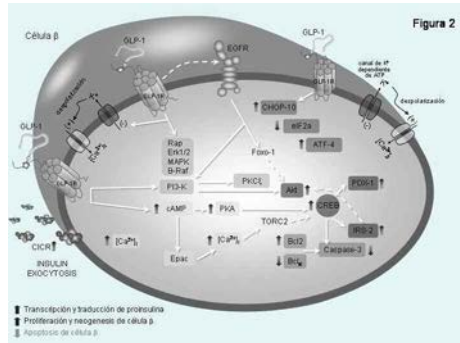
cie de ceguera específica hacia la hexosa por subexpresión del gen del GLUT-2, mutación del de la glucoquinasa, hiperactividad de la glucosa-6-fosfatasa, ausencia, heredada o adquirida, de la glicerolfosfato deshidrogenasa asociada al FAD mitocondrial, o incluso por una hiper-acumulación de glucógeno. De hecho, se sabe que, en el islote aislado de páncreas de rata, el GLP-1 mejora marcadamente la respuesta secretora de la célula β a determinados ésteres de ácidos tricarboxílicos –nutrientes no glucídicos– intermediarios en el ciclo de Krebs, aun en ausencia total de glucosa. Está documentado que la secreción de insulina inducida por GLP-1 también es mayor en presencia del dimetil ester del ácido succínico y glutámico, y de metilpiruvato, tanto en la rata normal como en la diabética tipo 2 –generada por tratamiento con STZ al nacer–. También, se ha observado que la α -D-glucosa pentaacetato, que no necesita del transportador de glucosa para acceder al interior de la célula β , potencia la respuesta secretora de ésta al GLP-1 en modelos de diabetes experimental, y aumenta, además, la secreción de insulina inducida por una sulfonilurea –gliquidona– y por un análogo de la meglitinida –repaglinida–.

En relación a ello, se detectó y caracterizó una unión específica del péptido, amidado y no amidado, en células pancreáticas de insulinoma de rata de la línea RINm5F, que no sólo no era desplazable por glucagón, GLP-2 o GIP, sino que también parecía estar asociada a un aumento en la producción de AMPc, sin modificación de los niveles de calcio. El receptor para GLP-1 en esa línea de células β está constituido por una proteína monomérica de 63 kDa de peso molecular que, por técnicas de estudios de unión, también se identificó en células pancreáticas normales de rata. Mediante hibridación y clonaje, se dedujo su estructura, que resultó tener 463 aminoácidos, y de la que se supo pertenece a la familia de receptores con siete hélices transmembrana acoplados a proteínas G, que incluye los de secretina, VIP (péptido intestinal vasoactivo), calcitonina, GHRH (hormona liberadora de la hormona de crecimiento), PTH (hormona paratiroidea) y glucagón, entre otros.

En los islotes, el receptor para GLP-1 se encuentra mayoritariamente localizado en las células β , aunque también se expresa en las α y δ ; su activación implica un aumento del contenido celular de AMPc, una activación de PKA y la alteración de factores de intercambio nucleotídico de guaninas regulados por AMPc. Además, agonistas del receptor promueven la fosforilación de CREB –elemento proteico de respuesta a AMPc–, y regulan su activación en respuesta a glucosa, a través de la traslocación del citosol al núcleo de TORC2 –coactivador de CREB–. La activación del receptor está también acoplada a un incremento del $[Ca^{2+}]_i$, inhibición de los

canales de K^+ dependiente de voltaje y activación de la expresión temprana de genes a través de efectos sobre Erk1/2, PKC y PI3K.

FIGURA 2



Vías de señalización de GLP-1 en la célula β pancreática. Mecanismos de liberación de insulina y proliferación celular.

El GLP-1, como el GIP, activa la formación de AMPc y PKA, aunque inhibidores de la PKA no anulan por completo el efecto de las incretinas sobre la secreción de insulina. Esta secreción de insulina independiente de PKA ha sido atribuida a los GEFs -factores de intercambio de nucleótidos guanina-, concretamente a Epac 2, también llamado GEFII-AMPc, ya que una reducción de la expresión de GEFII atenúa sustancialmente los efectos del GLP-1 sobre la secreción de insulina. Se ha descrito cierto papel del receptor de sulfonilurea -SUR- en la modulación del cierre del canal de K^+ dependiente de voltaje asociado al receptor de GLP-1. Aunque ambas incretinas activan la formación de AMPc en islotes SUR-/-, la secreción de insulina está claramente disminuida en estos ratones, seguramente debido a un defecto en el acoplamiento entre el AMPc y las rutas que regulan la exocitosis de insulina. Todo esto concuerda con la modulación por SUR 1 de la exocitosis regulada por Ca^{2+} dependiente de AMPc. El GLP-1, pero no el GIP, mantienen la acción insulínica en células Kir 6.2-/-, lo que evidencia una vez más la divergencia existente entre las rutas de señalización de ambas incretinas y la complejidad de la acción del canal de K^+ dependiente de ATP en la célula β .

A diferencia de otros secretagogos que actúan prioritariamente a través del canal de K^+ dependiente de ATP, el GLP-1 es capaz de restablecer los depósitos de insulina estimulando la expresión del gen de la proinsulina. Este efecto estaría mediado por la activación del proceso de transcripción del gen de la proinsulina y la estabilización del ARNm por mecanismos dependientes de AMPc e independientes de PKA.

Concretamente, el factor de transcripción Pdx-1 se comporta como una diana esencial en la acción del GLP-1 sobre la expresión del gen de la insulina. El GLP-1 incrementa Pdx-1, potenciando la expresión de su gen, y a su vez estimula la unión del factor al gen promotor de la insulina. Estudios realizados *in vitro*, en líneas celulares e islotes pancreáticos, e *in vivo*, en ratones con una inactivación del gen Pdx-1, demuestran que una disminución o una supresión de Pdx-1 está asociada a una disminución de la expresión del receptor de GLP-1 y una pérdida de acción del péptido en la célula.

El GLP-1 también disminuye la glucosa en sangre, en parte, por inhibición directa de la secreción de glucagón en las células α del islote, a través de la unión a su receptor y, en parte de forma indirecta, por su efecto sobre la secreción de insulina y somatostatina. Ratones con una inactivación específica en la célula β del gen de Pdx-1 muestran un defecto en la acción supresora de la exendina-4 (Ex-4) –agonista del receptor pancreático del GLP-1 en diferentes sistemas celulares– sobre la secreción de glucagón, lo que ilustra cierto papel de la célula β sobre la actividad secretora de la célula α . La supresión de la secreción de glucagón por el GLP-1, está regulada por glucosa, de manera que si la glucemia es normal este efecto supresor del péptido sobre la célula α es bloqueado, lo que ayuda a que el riesgo de hipoglucemia prácticamente no exista.

La activación del receptor pancreático del GLP-1 desencadena en líneas celulares exocrinas de roedores y humanos un programa de diferenciación hacia distintos fenotipos endocrinos, asociado a un incremento de la expresión de genes tales como Pdx-1, glucoquinasa y GLUT-2. Agonistas del receptor de GLP-1 pueden inducir diferenciación por activación de factores de transcripción tales como Foxa-2, que permiten un aumento en la expresión del gen Pdx-1. El GLP-1 es capaz además de promover la diferenciación de progenitores derivados de islotes humanos a células β funcionales. Estudios llevados a cabo con líneas celulares aisladas, en islotes normales o en roedores *in vivo*, muestran cómo la activación del receptor de GLP-1 también potencia la proliferación de células β . Tratamientos de cinco días con GLP-1 o Ex-4 en ratas Wistar expuestas a STZ el día de su nacimiento –diabéticas tipo 2–, mejoran la masa de célula β , y el efecto se prolonga incluso hasta dos meses. Un tratamiento similar con Ex-4, en este caso a ratas sometidas a un periodo de crecimiento uterino retardado, provoca, tras su nacimiento, una expansión de la masa celular que previene del desarrollo de diabetes. Este efecto de la Ex-4, agonista del receptor pancreático de GLP-1, sobre la expansión de la masa de islote, parece, al menos en

ratones diabéticos y en ratas con pancreatectomía parcial, asociado a la expresión de Pdx-1. Tanto la acción proliferativa como la apoptótica de los agonistas del receptor pancreático del GLP-1 sobre la célula β , es dependiente de la expresión de Pdx-1. En este sentido, se ha observado que si se reduce la expresión de Pdx-1, también disminuye el número de receptores de GLP-1 así como la respuesta in vitro a la Ex-4; y también cómo en ratones con Pdx-1/- inactivado de forma específica a nivel de célula β tienen un mayor apoptosis y una menor respuesta a la Ex-4.

El GLP-1 también mejora la protección y expansión de la célula β inhibiendo distintas rutas apoptóticas. El péptido disminuye la expresión del gen de la caspasa 3 y la fragmentación nuclear en islotes de ratas Zuker diabéticas, mientras la Ex-4 atenúa la apoptosis en ratones db/db y ratones salvajes tratados con STZ. La activación del receptor de GLP-1 reduce la apoptosis en células Min6 expuestas a especies reactivas del oxígeno –mediadoras de la citotoxicidad en la célula β – como el H_2O_2 , de manera dependiente a AMPc y PI3K, y asociado a un incremento en la expresión de Bcl₂ y Bcl_{xL} y a una reducción de la hidrólisis por PARP –poli(ADP-ribosa)polimerasa–. Ambos, GLP-1 y Ex-4, reducen la activación de caspasa 3 mediada por palmitato y la apoptosis mediada por PKA en células RINm5F. El aumento de AMPc inducido por el GLP-1 conduce a un aumento de la expresión de CREB, a una activación de IRS2 y a la potenciación de AKT. Por otro lado, el bloqueo dominante negativo de AKT in vitro suprime la acción antiapoptótica de la Ex-4 en islotes murinos pancreáticos tras exposición a citoquinas. La activación del receptor de GLP-1 in vivo también reduce el estrés del retículo endoplásmico (RE) en islotes de ratón, reduce la fosforilación de F2 α , promueve la activación de ATF4, CHOP y sXBP-1, y modula PERK en la ruta de estrés del RE en la célula β pancreática. Agonistas del receptor de GLP-1 estimulan la proliferación de célula β , en parte a través de la transactivación de EGFR o receptor del factor de crecimiento epidérmico. El GLP-1 también inhibe el factor transcripcional Foxo-1 en células del islote, a través de la exclusión nuclear dependiente de fosforilación de manera dependiente de EGFR, y la Ex-4 no estimula la replicación de la célula β ni la expansión de masa del islote en ratones transgénicos con expresión constitutiva de Foxo-1 en el núcleo.

En islotes murinos, el IRS-2 resulta esencial para que Ex-4 estimule, por fosforilación de AKT, la expresión de Pdx-1 y con ello el crecimiento de la célula β , pero no así en la secreción de insulina. Desde el punto de vista clínico, ambas acciones del GLP-1, proliferativa y antiapoptótica, han elevado la posibilidad de que éste

pueda ser utilizado para preservar el crecimiento de la masa celular tras transplante de islotes. Aunque la administración de Ex-4 a ratones transplantados no mejora el control glucémico, el pretratamiento con ésta de los cultivos de islotes que van a ser transplantados ayuda a revertir la hipoglucemia tras la intervención.

Cabe destacar que todos estos efectos del GLP-1 sobre la secreción de insulina, proliferación de célula β y supervivencia celular, han sido también confirmados en experimentos realizados con islotes humanos aislados. El GLP-1 induce la despolarización de la membrana, inhibe el flujo de K^+ dependiente de ATP y potencia la exocitosis de Ca^{2+} en célula β de humanos; además, acelera el flujo de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje (tipo L) y potencian la exocitosis en una zona alejada del punto de acumulación de Ca^{2+} intracelular. Así mismo, el péptido produce un rápido incremento del Ca^{2+} intracelular, que es inhibido por antagonistas de: AMPc ([Rp]-cAMPs), del canal de Ca^{2+} tipo L (nimodipines), de la ATPasa de Ca^{2+} presente en el RE (thapsigargina), o por rianodine. También promueve una de las rutas dependientes del factor de crecimiento epidérmico en islotes humanos in vitro con activación de Rap y B-Raf y, en ocasiones, con un incremento de la actividad ERK, AKT y PI3K; además, mejora la secreción de insulina estimulada por glucosa, incrementa la expresión de Bcl2 y disminuye la de Bax, mejorando la supervivencia celular en islotes humanos en cultivo durante 72 horas. También reduce la apoptosis en islotes humanos inducida por la elevación de glucosa y/o palmitato. Desde el punto de vista evolutivo, existen evidencias de que las rutas de señalización del GLP-1 están muy conservadas, siendo prácticamente idénticas en roedores y humanos.

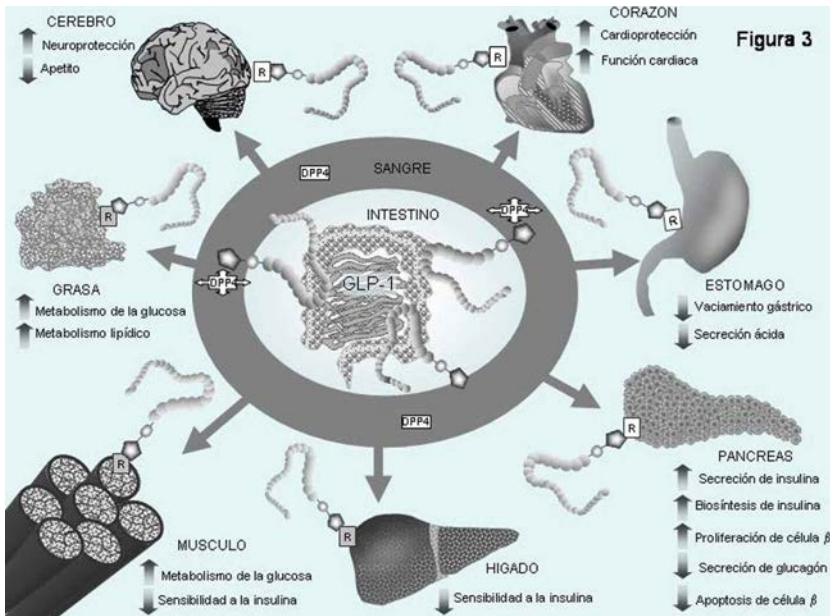
El GLP-1 también actúa directamente en el estómago, donde inhibe la secreción ácida y enlentece su vaciamiento; además, tiene acción sobre el sistema nervioso central, y parece intervenir en el control de la ingestión de alimentos, generando sensación de saciedad. Pero la investigación constante sobre las propiedades del GLP-1 está sacando a la luz otros efectos que, como el que se acaba de mencionar, no están directamente relacionados con el metabolismo de la glucosa. De hecho, se ha propuesto al GLP-1, y a análogos con capacidad de unión a su receptor cerebral, y de acción más prolongada, como posibles agentes terapéuticos en la enfermedad de Alzheimer y en otros procesos neurodegenerativos del sistema nervioso central y periférico. Esta última propiedad de péptido está basada en su demostrada acción neurotrófica en células neuronales en cultivo –a las que protege contra la apoptosis inducida por glutamato, y contra el daño oxidativo– y en su capacidad para modificar el proceso precursor de la proteína β amiloide, y reducir, en neuronas del

hipocampo, in vitro, y en función de la dosis, los niveles de la propia proteína. En relación a esto, se ha documentado en ratones, que el GLP-1 es un potente neuro-protector, y su receptor cerebral ha sido relacionado con el aprendizaje, puesto que aquellos animales con sobreexpresión del mismo en el hipocampo muestran una mayor capacidad de memorización.

Además, el GLP-1 incrementa en roedores la frecuencia cardíaca y la presión sanguínea, mejora la función endotelial en pacientes con diabetes tipo 2 y la función del miocardio –aumentando la captación de glucosa y la contractibilidad ventricular–, y también reduce el tamaño de los infartos en corazones perfundidos de rata y en modelos animales de isquemia miocárdica. Por lo que se propone al GLP-1 como un factor protector frente a la isquemia.

Últimamente, se ha postulado, además, que hormonas con carácter incretina, es decir, el GLP-1 y el GIP, intervendrían, directa o indirectamente, en el proceso de remodelado óseo que se produce tras la absorción de nutrientes.

FIGURA 3



Acciones del GLP-1 en tejidos periféricos. Efectos directos e indirectos sobre el páncreas, músculo, corazón, cerebro, tejido adiposo e hígado.

Las características del efecto antidiabético del GLP-1 dieron lugar a intuir su acción directa sobre el metabolismo de la glucosa, y ello impulsó la búsqueda de su receptor, a parte de en el páncreas, en otros tejidos participantes en la homeostasis del azúcar. Como consecuencia, se ha descrito la presencia de receptores específicos para GLP-1 en el tejido adiposo de la rata y del hombre –normal y diabético–, y su efecto estimulador de la concentración intracelular de AMPc. Los receptores para GLP-1 también están presentes en el hígado y en el músculo esquelético de la rata, tejidos en los que parece ser estructural y funcionalmente distinto del pancreático, puesto que no propicia en ellos la producción de AMPc; en el adiposo, sin embargo, no sólo estimula la generación de cAMP sino que, como en el caso del hígado y músculo, también promueve la generación de inositolfosfoglicanos (IPGs) –un segundo mensajero en la acción de la insulina–, con lo cual cabe la posibilidad de que la acción del GLP-1 en el adipocito esté mediada por dos tipos de receptor. Además, el GLP-1 mimetiza a la insulina en su efecto estimulador sobre los IPGs en una línea celular de miocitos en cultivo, la BC3H-1, en otra de hepatoma humano, la HepG2, y en adipocitos y hepatocitos aislados de rata; también es mimético de su acción en el tejido adiposo, en el músculo abdominal de ratón, y en distintas líneas de células musculares en cultivo. De hecho, el tejido adiposo de la rata, el GLP-1 no sólo estimula la lipólisis sino también la lipogénesis, además de la síntesis de glucógeno –a través de la activación de la glucógeno sintasa–, y el transporte, oxidación y utilización de glucosa, efectos, varios de ellos, adicionalmente descritos en el hígado y en el músculo esquelético tanto de la rata como del hombre. También se han detectado receptores para GLP-1 en las glándulas oxínticas del estómago, en el pulmón y, en el cerebro.

La acción directa del GLP-1 sobre el metabolismo de la glucosa en tejidos extra-pancreáticos concuerda, además, con resultados de estudios in vivo, en los que el tratamiento de la rata con el péptido durante 48 horas mejora la intolerancia a la glucosa que aparece con el envejecimiento. Además, el GLP-1 regula, a nivel traduccional o post-traduccional, la expresión del GLUT-2 y GLUT-4 en hígado, músculo y tejido adiposo de la rata normal y diabética. También se ha demostrado que, en el perro, el GLP-1 incrementa la utilización de glucosa en el hígado, que la consecución de su efecto requiere su infusión prolongada, y que éste es aditivo al de la insulina, independientemente de la vía de administración.

La propuesta de utilización del GLP-1 como agente terapéutico en la diabetes tipo 2 no sólo viene reforzada por lo anterior, sino también por el hecho de que el carác-

ter antidiabético del GLP-1 es evidente tras su inyección subcutánea en estos pacientes, en los que, sea o no amidado, tiene, además, efecto insulínotropico. Pero la vida media del GLP-1, una vez en el torrente circulatorio, es menor de 2 minutos, al ser degradado por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), que le hace perder sus dos residuos aminoácidos N-terminales, transformándolo en GLP-1(9-36)amida, al cual no se atribuye, de momento, ningún efecto fisiológico. Si bien se han puesto grandes expectativas, ese inconveniente conduce a otro: su administración habría de ser en infusión continua o inyección subcutánea frecuente. Ello, no obstante, no descarta al GLP-1 para su posible utilización futura, y la eliminación del obstáculo es investigada, de forma constante, en distintos laboratorios. De hecho, hace tiempo se propuso su dosificación en forma de tableta inserta en la mucosa bucal, vía sin efectos secundarios, por la que el péptido aumenta la secreción de insulina, disminuye la de glucagón, y reduce la glucemia hasta niveles normales, tanto en ayunas como tras la absorción de nutrientes por el intestino. Pero también se están tratando de confeccionar análogos del GLP-1 resistentes a la acción de la DPP-IV, como es un derivado acilado del péptido, el NN2211, de efecto prolongado, con el que una sola inyección diaria reduce la glucemia, basal y post-prandium, en el diabético tipo 2; o de obtener inhibidores de la acción de la propia enzima. Mientras tanto, no obstante, surge otro péptido, la exendina 4 (Ex-4), para su estudio, del que se ha descrito que posee todos los beneficios fisiológicos y farmacológicos del GLP-1, y no es degradado por la DPP-IV

La propiedad de la Ex-4 como agonista del receptor del GLP-1 se describió en 1993. Es un péptido de 39 aminoácidos, presente en el veneno de la glándula salival de una especie de lagarto –*Heloderma suspectum*–, y que tiene un 53% de homología estructural con el GLP-1. A pesar de que su naturaleza no es mamífera, se ha tratado, aunque sin éxito, de identificar en el hombre su gen homólogo; sin embargo, está demostrado que la Ex-4 es un potente insulínotropico en roedores y en el hombre, y que posee todas las propiedades del GLP-1, con dos ventajas: su potencia, mucho mayor, y su acción *in vivo*, más prolongada. Como el GLP-1, la Ex-4 tiene la propiedad de mejorar el grado de tolerancia a la glucosa, tanto en estado normal como diabético, y de inducir la formación de AMPc en la célula β pancreática, además de incrementar su masa bien por diferenciación y neogénesis, o por replicación de células β pre-existentes.

La mayor estabilidad *in vivo* de la Ex-4 respecto al GLP-1 –que puede atribuirse a la ausencia de puntos sensibles a la DPP-IV en su secuencia amino-terminal, y a su

reducida susceptibilidad a degradación por endopeptidasa neutra 24.11–, ilustra su carácter beneficioso. Concretamente, la Ex-4 sintética, o AC2993, que es utilizada en investigación clínica como hipoglucemiante, y otros análogos del GLP-1 más resistentes a la DPP-IV –como el LY307161–, producen, en modelos animales de diabetes, efectos antidiabéticos muy prometedores. Ensayos clínicos en fase 3, en los que se inyecta exenatide (Ex-4), dos veces al día –5 o 10 µg– durante 30 semanas, a pacientes en los que ni metformina ni sulfonilureas eran capaces de ejercer un buen control glucémico, muestran cómo este agonista del receptor de GLP-1 es capaz de reducir, en el 34-46% de los pacientes, los niveles de HbA1c en un 0,9% y de forma modesta el peso corporal; su principal efecto adverso fue la náusea, y aunque se detectaron anticuerpos anti-exendina-4 en el 41-49% de los pacientes tratados, ello no estuvo relacionado con la respuesta terapéutica al péptido. Un tratamiento durante 26 semanas con exenatide produce además una reducción de HbA1c comparable a la de la insulina glargina (~1,1%), una potente disminución de la glucemia postprandial aunque su efecto sobre la glucemia en ayunas es algo más limitada que la de glargina, y una pérdida de peso de 2,3 Kg frente a la ganancia 1,8 Kg observada con insulina glargina. En el caso de análogos de GLP-1 resistentes a la acción de la DPP-IV, Liraglutide (NN2211) –molécula de GLP-1 acilada que se asocia de forma no covalente a la molécula de albúmina– es capaz de mimetizar la acción del péptido nativo reduciendo los niveles de glucosa en sangre de pacientes diabéticos tipo 2. La forma resistente de la Ex-4 (exenatide-LAR) es también capaz de alcanzar el control glucémico en semanas tras una sola inyección en ratas diabéticas, efecto que está en fase 2 de ensayos clínicos en humanos.

El papel de las incretinas ha sido objeto de estudio los últimos 20 años, concretamente los numerosos efectos descritos del GLP-1, tanto sobre la célula β , como sobre tejidos extrapancreáticos tales como el cerebro, el músculo, la grasa o el corazón, han hecho que algunos derivados de éste y de una molécula estructuralmente relacionada, como es la Ex-4, se encuentren en fase avanzada de investigación clínica, con resultados más que prometedores en cuanto al control de la homeostasis de la glucosa y peso corporal. El conocimiento de los mecanismos que controlan la secreción y acción del GLP-1 a nivel proliferativo y antiapoptótico, aun escaso, permitirá su aplicación en la posible reversión del desarrollo natural de la diabetes tipo 2.

Bibliografía seleccionada

Valverde, I., Villanueva-Peñacarrillo, M.L., Malaisse, W.J.: Pancreatic and extrapancreatic effects of GLP-1. *Diabetes Metab.*, 28: 3S85-3S89, 2002.

Drucker, D.J.: The Biology of incretin hormones. *Cell Metabolism* 3, 153-165, 2006.

Holst, J.J.: Glucagon-like peptide-1: from extract to agent. The Claude Bernard Lecture, 2005. *Diabetologia* 49: 253-260, 2006.

Salehi M, D'Alessio DA. New therapies for type 2 diabetes based on glucagon-like peptide 1. *Cleve Clin J Med.* 73: 382-9, 2006.

Valverde, I., Cancelas, J., Villanueva-Peñacarrillo, M.L.: El GLP-1: acción biológica y posibles efectos terapéuticos. *Endocrinol. Nutr.* 53: 261-267, 2006

Meier JJ, Nauck MA. Incretins and the development of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep.* 6:194-201, 2006.

<http://www.glucagon.com>

<http://www.incretinasydiabetes.com.ar>

CAPÍTULO 7

Trasplante de islotes de páncreas y terapia celular en diabetes

AUTORES

Eduard Montanya Mias*
Montserrat Nacher García**
Noèlia Téllez Besolí***

*Jefe de Sección. Servicio de Endocrinología.
Hospital Universitari de Bellvitge.

Profesor Asociado. Departamento de Ciencias Clínicas. Facultad de
Medicina Universidad de Barcelona.

**Facultativo Especialista. Servicio de Endocrinología. Hospital
Universitari de Bellvitge.

***Investigador, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL),
Servicio de Endocrinología, Hospital Universitari de Bellvitge.

La diabetes mellitus es un grave problema sanitario tanto por la prevalencia de la enfermedad como por las graves complicaciones crónicas que desarrollan los pacientes. Las previsiones para los próximos años son pesimistas ya que se espera que el número de pacientes aumente desde los 171 millones del año 2000 a 366 millones en el año 2030, en lo ya se conoce como epidemia de diabetes.

Aunque los resultados obtenidos en la última década del siglo pasado han establecido con certeza que el control metabólico adecuado permite reducir y posponer el desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes, el tratamiento actual con insulina o con otros agentes hipoglicemiantes no permite alcanzar en la mayoría de los casos el grado de control necesario para evitar las complicaciones crónicas de la diabetes. Por otra parte, el tratamiento impone unas elevadas demandas sobre el paciente, tiene riesgos importantes como la hipoglucemia grave, y reduce la calidad de vida. Un aspecto central en el desarrollo de la diabetes es la reducción en el número de células beta pancreáticas productoras de insulina, y la incapacidad para producir suficiente insulina para mantener la normoglucemia. En el caso de la diabetes tipo 1 la destrucción progresiva de las células beta da lugar a una reducción en términos absolutos de la masa beta. En la diabetes tipo 2, la función y masa de las células beta es insuficiente para hacer frente al aumento en la demanda de insulina generado por la resistencia a la insulina.

Las limitaciones del tratamiento actual de la diabetes han estimulado la búsqueda de terapéuticas que permitan restaurar la masa beta perdida para conseguir alcanzar la normoglicemia. El trasplante de páncreas es en la actualidad el único tratamiento de la diabetes que consigue restaurar la normoglicemia a largo plazo, pero puede ser ofrecido tan solo a un número limitado de pacientes y aunque su mortalidad se ha reducido notablemente presenta una morbilidad importante. Alternativamente, el trasplante celular de la diabetes, ya sea de islotes pancreáticos o únicamente de células productoras de insulina ofrece numerosas ventajas potenciales que lo hacen particularmente atractivo. En la tabla 1 se enumeran las distintas posibilidades de obtención de células productoras de insulina que se contemplan en la actualidad. De todas ellas el trasplante de islotes es la única que ha alcanzado por el momento un uso clínico.

El trasplante de islotes ofrece ventajas comprobadas como son el bajo ries-

TABLA 1

Origen potencial de las células productoras de insulina para el trasplante celular

Islotes humanos
- Islotes de donantes cadáver. (usados en el trasplante de islotes en la actualidad) - Expansión ex-vivo de los islotes.
Islotes Xenogénicos
Células productoras de insulina generadas por bioingeniería
- Líneas celulares beta de roedores transformadas. - Líneas celulares beta humanas transformadas. - Células neuroendocrinas transformadas - Células somáticas: - con algunas propiedades de las células beta (células hepáticas, intestinales, células K) - no relacionadas con las células beta (fibroblastos, células musculares)
Células Madre
- Embrionarias - Adultas : - pancreáticas - extrapancreáticas

go del procedimiento, su realización en régimen casi ambulatorio y la facilidad para llevar a cabo repetidos trasplantes. Como objetivo de más largo alcance, el trasplante de islotes pretende evitar la necesidad de tratamiento inmunosupresor, y para ello se investigan estrategias basadas en el uso de métodos para separar físicamente los islotes del sistema inmunológico (encapsulación) o en la modificación de las características inmunogénicas de los islotes trasplantados. Si se lograra suprimir el riesgo asociado al tratamiento inmunosupresor, sería clínica y éticamente aceptable llevar a cabo el trasplante en fases iniciales de la enfermedad para restaurar así la normoglicemia desde el diagnóstico de la diabetes, mucho antes de la aparición de las complicaciones.

Historia del Trasplante de Islotes

Aunque existen intentos de finales del siglo XIX y principios del XX de trasplantar fragmentos de páncreas que podrían considerarse como los antecedentes del trasplante de islotes, la era moderna del trasplante de islotes empieza con la descripción por Paul Lacy en 1967 de un método para obtener los islotes mediante la digestión del páncreas con colagenasa que le permitió aislar y trasplantar suficientes islotes para conseguir en 1972 curar la diabetes de animales diabéticos.

El progreso en el campo del trasplante de islotes ha estado condicionado en buena medida por la dificultad del aislamiento de los islotes, y los sucesivos avances técnicos del procedimiento. Los trasplantes realizados en los años 70 y 80 fracasaron de forma sistemática, hasta que en 1988 Camillo Ricordi introdujo un método semiautomatizado para el aislamiento que permitió obtener un número elevado de islotes y el año siguiente Lakey describió un método automatizado para la purificación de los islotes que permitió acelerar de forma importante el proceso. Estos métodos se han convertido, con modificaciones, en la técnica usada universalmente para el aislamiento de islotes para el trasplante en humanos y que permitió que en 1990 diversos grupos lograran por primera vez que pacientes con diabetes tipo 1 pudieran suspender el tratamiento con insulina y mantener la normoglicemia tras un trasplante de islotes. El entusiasmo inicial que estos resultados generaron se vio pronto frenado al comprobar la pronta reaparición de la hiperglicemia en los escasos trasplantes con éxito. A pesar de que la sustitución de la colagenasa por la Liberasa (colagenasa muy purificada) como enzima para la digestión del páncreas exocrino supuso una avance muy importante que permitió un mayor rendimiento y reproducibilidad del aislamiento con un menor daño a los islotes, de los pacientes trasplantados en la década de los 90, tan solo el 12% alcanzaron en algún momento la insulín-independencia, y únicamente el 8% la mantuvieron durante más de un año. Esta situación se vio modificada radicalmente en el año 2000 con la obtención y mantenimiento de la insulín-independencia en siete pacientes consecutivos que fueron trasplantados en Edmonton (Canada) usando un protocolo que combinaba el trasplante de un número muy elevado de islotes junto con una inmunosupresión libre de esteroides, en lo que se conoce desde entonces como el protocolo de Edmonton. Este protocolo ha sido adaptado por el resto de centros que trasplantan islotes y ha conseguido aumentar de forma muy importante el éxito del

procedimiento. Los datos de seguimiento más recientes indican sin embargo, que la función del injerto se deteriora progresivamente de forma que en la gran mayoría de los casos los pacientes vuelven a recibir insulina a los 5 años del trasplante, aunque en general con dosis muy reducidas y que permiten mantener un buen control metabólico. Si bien la historia del trasplante de islotes es la combinación de avances que generan grandes expectativas y de decepciones que ocasionan el desánimo y escepticismo respecto a las posibilidades reales como tratamiento de la diabetes, una visión de conjunto permite apreciar el enorme progreso conseguido.

Dificultades y Limitaciones Actuales del Trasplante de Islotes

A pesar del progreso logrado en los últimos años, persisten aun dificultades y limitaciones que impiden la aplicación generalizada del trasplante de islotes en el tratamiento de la diabetes, y que de forma clarificadora pueden agruparse en la dificultad técnica del proceso de aislamiento de islotes, la insuficiente cantidad de islotes disponibles para trasplantar y la pérdida de función y destrucción de los islotes una vez trasplantados.

Aislamiento de Islotes

La obtención de los islotes se lleva a cabo a partir de páncreas de donantes multiorgánicos mediante el método de Ricordi. Los elementos fundamentales del proceso son la digestión mediante colagenasa y la purificación posterior mediante centrifugación. El páncreas es transportado en frío al laboratorio desde el quirófano donde se distiende por la inyección intraductal de la solución que contiene la colagenasa y se coloca en una cámara de Ricordi conectada a un circuito cerrado con recirculación constante de la solución a temperatura controlada, para ser digerido por la combinación de la acción enzimática de la colagenasa y la agitación suave de la cámara (figura 1a). El proceso se mantiene hasta la separación de los islotes del páncreas exocrino, lo que requiere una toma secuencial de muestras que se monitorizan bajo el microscopio para identificar los islotes y detener la digestión en el momento adecuado, ya que una digestión

FIGURA 1

Aislamiento de islotes pancreáticos



Figura 1a

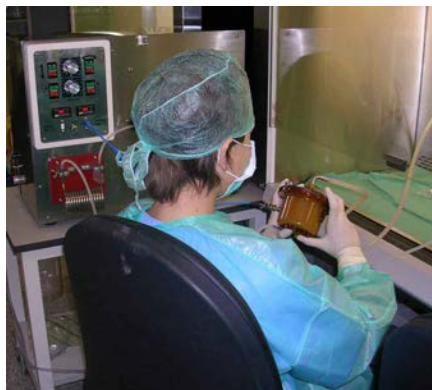


Figura 1b

Figura 1a: Digestión del páncreas en la cámara de Ricordi mediante proceso enzimático y agitación en circuito cerrado con control de temperatura y velocidad de flujo.

Figura 1b: Purificación de los islotes tras la digestión del páncreas en el procesador de células sanguíneas COBE 2991.

demasiado corta no permite la separación de los islotes y una digestión prolongada conlleva su destrucción. La preparación obtenida es a continuación purificada mediante un gradiente de densidad continuo en un procesador de células sanguíneas (COBE 2991) (figura 1b). Una vez purificada, la preparación de islotes obtenida puede ser ya trasplantada o mantenida en cultivo entre 1-3 días hasta su trasplante. El procedimiento lo realiza un equipo de unas 4 personas que invierten en el proceso una jornada laboral. Todo el proceso se lleva a cabo en un laboratorio con condiciones GMP (good manufacturing practice) y control de partículas ambientales, presión positiva y control de temperatura.

El procedimiento tiene numerosos aspectos críticos de los que depende que se pueda conseguir un número suficiente de islotes, con una viabilidad y funcionalidad adecuada, y con la pureza precisa. Un aspecto fundamental es la obtención del páncreas en óptimas condiciones por parte de un equipo quirúrgico entrenado. Otros aspectos importantes están relacionados con la calidad de la colagenasa, con el donante (edad, obesidad, estabilidad hemodinámica previa) y por supuesto con la habilidad técnica del equipo que realiza el aislamiento. El conjunto del proceso da lugar a una pérdida importante de islotes y permite recuperar, en los casos exitosos tan solo alrededor del 30-50% de los islotes del páncreas. Así mismo, el aislamiento y purificación dan lugar a un stress mecánico y químico que lesiona los islotes. La dificultad global del proceso queda demostrada si consideramos que incluso en los centros más entrenados menos del 50% de los páncreas procesados permiten obtener una preparación de islotes adecuada para ser trasplantada. El elevado coste de la construcción del laboratorio GMP y su equipamiento es una dificultad añadida al proceso, igual que el coste de los fungibles utilizados, en particular la Liberasa, y los gastos de personal que supone el equipo de aislamiento.

Escasez de Islotes para trasplante

La única fuente actual de células beta para trasplante son los donantes de órganos. En España, que tiene la tasa más alta de donación de órganos del mundo, se producen unas 1500 donaciones por año. Sin entrar a considerar que una parte de estos órganos estarán destinados al trasplante de páncreas, o que en muchos casos el aislamiento no conseguirá obtener una preparación islotes válida para el trasplante, ni la posible indicación del trasplante en la diabetes tipo 2, es a todas luces imposible hacer frente a los alrededor de 100.000 pacientes con diabetes tipo 1 y ni tan solo a los cerca de 2000 nuevos pacientes que cada año se diagnostican entre la población menor de 30 años en España. La desproporción es aún más grave si se considera que, en las condiciones actuales, se necesita más de un páncreas para obtener suficientes islotes para trasplantar un único paciente. Por lo tanto, se hace imprescindible disponer de fuentes alternativas de células productoras de insulina, que podrían ser islotes, células beta u otras células modificadas para secretar insulina, para que el trasplante pueda ser un tratamiento generalizado de la diabetes.

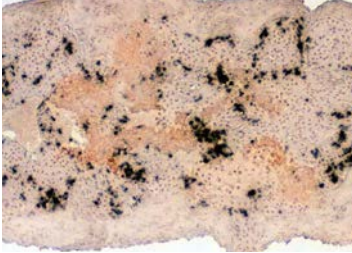
Las opciones que se contemplan actualmente para resolver la falta de islotes se enumeran en la tabla 1. El xenotrasplante permitiría recurrir a otras especies para incrementar el número de islotes disponibles de forma prácticamente ilimitada. El cerdo es el potencial donante que ha suscitado mayor interés, no sólo en el caso del trasplante de islotes, y cabe recordar que la insulina porcina ha sido usada durante años sin problemas en el tratamiento de la diabetes. El xenotrasplante se enfrenta al reto de superar el problema del rechazo, y al riesgo de la transmisión de zoonosis de la especie donante a los humanos. La generación de animales transgénicos, diseñados para ser fuente de órganos para el trasplante en humanos, podría permitir disponer de una fuente ilimitada de islotes y al mismo tiempo resolver o paliar el problema del rechazo. Alternativamente, los sistemas de encapsulación de islotes podrían tener su principal aplicación en el xenotrasplante. Sin embargo, el riesgo de la transmisión de zoonosis ha llevado a la instauración de moratorias para el xenotrasplante en algunos países. Este riesgo que estaría incrementado por el uso de tratamientos inmunosupresores que podrían facilitar la infección, o en caso de proteger a los islotes mediante encapsulación por la dificultad de acceder a la fuente de la zoonosis.

Una vía alternativa para superar el déficit de islotes es la generación de células productoras de insulina mediante la estimulación de la replicación de los islotes, la creación de líneas celulares, o la inducción de diferenciación a partir de precursores pluripotenciales, campos en los se han producido avances muy significativos en los últimos años. Aunque la capacidad de crecimiento de los islotes adultos es limitada, ha sido posible inducir su proliferación *in vitro*. Sin embargo, el incremento de la proliferación se ha visto hasta el momento inevitablemente acompañado de la desdiferenciación de las células beta humanas que pierden la capacidad de producir insulina. El ducto pancreático se considera la fuente de células precursoras de los islotes, y recientemente se ha conseguido demostrar que es posible expandir *in vitro* tejido del ducto pancreático humano, para a continuación dirigir su diferenciación hacia islotes pancreáticos. Las posibilidades que ofrecen las técnicas de bioingeniería para la generación de células productoras de insulina son múltiples, ya sea para inducir la diferenciación de islotes a partir de células precursoras, estimular la replicación de las células beta, o crear líneas celulares productoras de insulina a partir de células beta o de células no endocrinas. Diferentes revisiones han analizado estas posibilidades de forma exhaustiva, y los capítulos 8 y 9 de esta monografía proporcionan una perspectiva excelente de la situación actual.

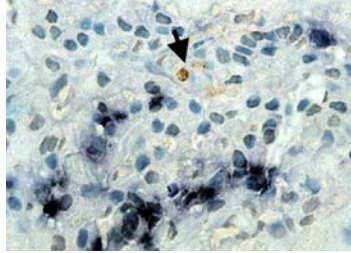
FIGURA 2

Destrucción de islotes pancreáticos en los primeros días después del trasplante

Necrosis



Apoptosis



Las figuras muestran las abundantes zonas de necrosis (figura a) y la presencia de apoptosis en las células beta (figura b), a los tres días del trasplante singénico en ratones diabéticos. En conjunto se produce una pérdida inicial de alrededor del 60% del tejido trasplantado. Esta pérdida precede a la destrucción posterior que pueda ocasionar el rechazo o la recurrencia del proceso autoinmune (ref. 4).

Destrucción de los Islotes Trasplantados.

Un aspecto específico del trasplante de islotes es la lesión y muerte que se produce en los primeros días, y que no depende del rechazo ni de la reaparición del proceso autoinmune que ocasionó la diabetes en el paciente. Datos de trasplantes experimentales indican que en los primeros días tras el trasplante se produce la muerte del 60-70% de las células beta trasplantadas por procesos de necrosis y apoptosis (figura 2), y estudios funcionales en pacientes sugieren que ocurre un proceso similar en el trasplante de islotes en pacientes. Esta pérdida inicial de islotes contribuye a elevar el número de islotes preciso para restaurar la normoglicemia y puede jugar también un papel en el pronóstico a largo plazo del trasplante. Las causas de la lesión inicial de los islotes son múltiples, y entre ellas se ha considerado la lesión de los islotes durante el proceso de aislamiento, problemas técnicos del aislamiento, hipoxia de los islotes, ausencia de factores de supervivencia presentes en el páncreas, disrupción de las conexiones con la matriz extracelular, o inflamación no específica en el lugar de implante. Numerosos estudios experimentales están centrados en la investigación de estos aspectos, y algunos de ellos han centrado el interés de nuestro grupo a nivel experimental.

Pasado el periodo inicial, la supervivencia de los islotes trasplantados requiere la necesidad de evitar el rechazo del tejido trasplantado, al igual que ocurre con otros trasplantes, pero plantea también la necesidad de evitar la destrucción de las células beta trasplantadas por la recurrencia del proceso autoinmune que en su momento causó la destrucción de las células beta del páncreas del paciente con diabetes tipo 1. La necesidad de usar tratamiento inmunosupresor para evitar esta destrucción del injerto por parte del sistema inmune del receptor es una limitación para la aplicación del trasplante de islotes a una mayoría de la población diabética ya que, a diferencia del trasplante de órganos vitales como corazón o hígado para los que no existe terapia sustitutiva, el trasplante de islotes debe competir en seguridad con el tratamiento con insulina, y la relación beneficio/riesgo del binomio trasplante/inmunosupresión debe demostrar ser superior a la de mantener el tratamiento con insulina. Los tratamientos inmunosupresores actuales dan lugar a efectos secundarios importantes, con toxicidad sobre órganos que pueden verse afectados también por la diabetes, en particular el riñón, y aumentan el riesgo de neoplasias y de infecciones oportunistas. Esta toxicidad limita la indicación del trasplante a los pacientes en los que el beneficio superará claramente al riesgo, en la práctica los pacientes que ya reciben tratamiento inmunosupresor por la presencia de otro trasplante, casi en su totalidad pacientes con nefropatía diabética con un trasplante renal, o los pacientes que padecen una inestabilidad metabólica realmente grave. Así mismo debe considerarse la toxicidad del tratamiento inmunosupresor sobre los propios islotes trasplantados, que parece contribuir de forma significativa a la pérdida de islotes trasplantados a los que teóricamente protege. Es patente que mientras no se posible evitar el tratamiento inmunosupresor es necesario conseguir pautas de inmunosupresión menos tóxicas tanto para el receptor como para los islotes trasplantados.

Otras consideraciones

Además de las dificultades científicas y técnicas, el avance y desarrollo de los programas de trasplante de islotes han contado con otros impedimentos. Una cuestión que quizás no ha sido suficientemente comprendida son las especiales necesidades de infraestructura y recursos humanos que son imprescindibles para establecer un programa de trasplante de islotes con garantías de éxito. Por

lo que respecta a infraestructura, es preciso contar con un laboratorio especializado en islote pancreático, en el que pueda llevarse a cabo la digestión del páncreas y la purificación de los islotes, además de poder valorar la viabilidad y función de los islotes aislados tanto *in vitro* como *in vivo* al trasplantarlos a animales de experimentación. Este aspecto es relevante, ya que la calidad de las preparaciones de islotes obtenidas, y que condicionaran las posibilidades de éxito del trasplante, es variable incluso aún dentro de un mismo laboratorio. Las condiciones del laboratorio y de los productos empleados en el aislamiento y cultivo deben garantizar que los islotes obtenidos cumplan las garantías de esterilidad y falta de toxicidad exigidas para tratamientos en humanos, lo que eleva de forma significativa el coste de la instalación para que cumpla las condiciones de GMP. Es preciso contar en el laboratorio con la presencia de personal técnico cualificado, con un buen conocimiento de la fisiología del islote pancreático, capaz del procesamiento y análisis de los islotes. Esta infraestructura de material y personal es ajena a la mayoría de servicios clínicos hospitalarios, y ha limitado de forma importante el número de centros con capacidad para realizar trasplante de islotes.

El Protocolo de Edmonton. Características y Resultados Actuales

Antes del año 2000 tan solo alrededor del 10% de los pacientes que recibían un trasplante de islotes podían suspender el tratamiento con insulina por más de un año, y un 28% mantenían una función beta residual del injerto indicada por los niveles detectables de péptido C plasmático. En el año 2000, Shapiro y colaboradores en la Universidad de Alberta, en Edmonton, describieron un nuevo protocolo para el trasplante de islotes con el que con el que ha pasado a conseguir la insulino-independencia en hasta el 80 % de pacientes al año del trasplante. Estos resultados han sido parcialmente reproducidos en un estudio internacional, el International Network Trial (INT), y en el que el 58% de pacientes consiguieron la independencia de la insulina, aunque con amplias variaciones entre centros (desde el 100% al 0% de pacientes) que obedecían fundamentalmente a la experiencia previa del grupo en trasplante de islotes. Sin embargo, los datos de seguimiento a más largo plazo muestran un deterioro de la función del injerto de forma que a los 2 años del trasplante tan solo el 24% de pacien-

tes mantenían la insulín-independencia en el estudio INT, porcentaje que el grupo de Edmonton ha descrito que se reduce hasta el 10% a los 5 años. Estos resultados a largo plazo han supuesto una cierta decepción, pero es importante señalar que en cerca del 70% de los pacientes el injerto muestra una función beta residual, y que estos pacientes mantienen un control glucémico óptimo con dosis muy bajas de insulina, con gran estabilidad metabólica (indicado por una reducción en la amplitud de las excursiones glucémicas), y sin episodios de hipoglucemias graves.

Los cambios más importantes introducidos por el protocolo de Edmonton y que pueden haber contribuido al éxito obtenido han sido: 1) el uso de una fuerte inmunosupresión en la que se prescindió de los glucocorticoides y se incluyó sirolimus, bajas dosis de tacrolimus y un anticuerpo monoclonal frente al receptor de la interleuquina-2 (daclizumab); 2) la evitación en el proceso de aislamiento de los islotes del uso de productos que pudieran contener xenoproteínas con la intención de reducir la destrucción inmediata tras el trasplante; 3) la minimización del tiempo de isquemia trasplantando los islotes inmediatamente después del aislamiento, aunque este aspecto se ha abandonado en estudios posteriores siendo común en la actualidad trasplantar los islotes tras 2-3 días de cultivo; 4) el trasplante de una masa beta superior a la usada previamente, con una media de más de 4000 islotes equivalente por kilogramo de peso y la repetición del trasplante en 2-3 ocasiones en caso de detectar glicemias superiores a 200 mg/dl en las semanas posteriores al trasplante; 5) trasplantar a una población receptora distinta de las usadas hasta entonces, que no presentaba insuficiencia renal, en su mayoría pacientes con episodios repetidos de hipoglucemia grave.

Aunque el proceso no ha tenido mortalidad y su morbilidad es baja comparada con el trasplante de órganos, el procedimiento no está exento de efectos adversos algunos de ellos graves. En relación al procedimiento quirúrgico son destacables la presencia de sangrado grave -que en algún caso ha requerido nueva cirugía - en un 10% de pacientes, la trombosis de la porta o alguna de sus ramas (6%), y la elevación transitoria de enzimas hepáticas. Como eventos adversos no graves más frecuentes se describen las úlceras bucales (92%), anemia (81%), leucopenia (75%), diarrea (64%), cefalea (56%), neutropenia (53%), náusea (50%), vómito (42%), acné (39%) y astenia (39%). Hasta el momento no se ha descrito la aparición de neoplasias malignas en los pacientes con trasplante de islotes y tratamiento inmunosupresor.

Futuro

La terapia celular de la diabetes, bien mediante el trasplante de islotes bien de células productoras de insulina, es una opción muy atractiva para la curación de la diabetes. Sin embargo, en las actuales circunstancias su aplicación está limitada a unos escasos pacientes y centros. Para poder generalizar esta opción a la mayoría o al menos a un número significativo de pacientes la investigación debe resolver problemas fundamentales que se han mencionado a lo largo de este capítulo. Deben mejorarse las condiciones técnicas del aislamiento de islotes para aumentar el rendimiento y la reproducibilidad del proceso, y la funcionalidad de los islotes obtenidos. La preservación de la masa beta trasplantada ofrece diversos campos de actuación, antes y después del trasplante. Debe reducirse la muerte de islotes que ocurre inmediatamente después del trasplante y que no obedece a rechazo, aspecto en el que se han reportado interesantes datos a nivel experimental con el uso de estrategias de terapia génica para mejorar la capacidad de supervivencia de los islotes. Se deben encontrar también nuevas formas de proteger a medio y largo plazo los islotes del rechazo y de la recurrencia de la destrucción autoinmune con sistemas menos tóxicos para el paciente y para los propios islotes que los actuales fármacos inmunosupresores. Los avances en estos aspectos pueden venir, entre otros, del uso de nuevos inmunosupresores, de la inducción de tolerancia, o de la protección de los islotes con estrategias de terapia génica o físicas por sistemas de encapsulación. Finalmente, para poder hacer frente a la enorme demanda debida al potencial número de receptores del trasplante es preciso disponer de sistemas de expansión de los islotes in vitro, o de fuentes alternativas de células productoras de insulina ya sea de origen humano o de otras especies. La generación de células beta a partir de células madre embrionarias o de posibles células madre adultas es una alternativa prometedora. Sin embargo, es improbable que los conocimientos actuales en este campo permitan obtener en los próximos años una fuente ilimitada de células productoras insulina válida para uso clínico, por lo que posiblemente el trasplante de islotes seguirá siendo a corto plazo la única terapia celular sustitutiva aplicable clínicamente al tratamiento de la diabetes.

Bibliografía seleccionada

Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 1988;37:413-420

Weir GC, Bonner-Weir S. Scientific and political impediments to successful islet transplantation. *Diabetes* 1997;46:1247-1256.

Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. *N Engl J Med* 2000;343:230-38. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen.

Biarnés M, Montolio M, Raurell M, Nacher V, Soler J, Montanya E. β -cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short and long-term hyperglycemia. *Diabetes* 2002;51: 66-72.

Rother KI, Harlan DM. Challenges facing islet transplantation for the treatment of diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2004;114:877-883.

Montanya E. Islet and stem cell-based tissue engineering in diabetes. *Curr Opin Biotech* 2004;15:435-440.

Ryan EA, Lakey JR, Paty BW et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005;54:2060-2069.

Documento de consenso sobre trasplante de páncreas e islotes. Organización Nacional de Trasplantes. Grupo Aula Médica, SL. Madrid, 2005.

Shapiro AMJ, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP et al. International Trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 2006;355:1318-1330.

Tellez N, Estéles E, Montolio M, Escoriza J, Soler J, Montanya E. Adenoviral overexpression of interleukin-1 receptor antagonist protein (IRAP) increases β -cell replication and mass in syngeneically transplanted rat islets and improves metabolic outcome. *Diabetologia* 2007; 50:602-611.

CAPÍTULO 8

Desarrollo embrionario del páncreas y regeneración en el páncreas adulto

AUTORES

Albert Barberà
Rosa Gasa

Investigadores
Laboratorio Diabetes y Obesidad
Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer
www.diabetisiobesitat.org

En la actualidad se sabe que la pérdida de masa y función de la célula beta es un punto determinante en el desarrollo de la mayoría de diabetes. Por lo tanto, cualquier aproximación terapéutica a la cura de esta enfermedad debe afrontar la necesidad de reemplazar o evitar esta disminución de célula beta. Para conseguir este objetivo se pueden utilizar diferentes estrategias: por un lado se puede estimular la renovación de las células beta in situ, o por el otro reponer las células beta mediante el trasplante de islotes procedentes de un donante o de células beta generadas in vitro. Sea cual sea la estrategia que se escoja, se necesita un amplio conocimiento de los mecanismos que regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia de la célula beta in vivo. Es por eso que en la actualidad se están haciendo grandes esfuerzos para conocer las bases moleculares que controlan la homeostasis y la diferenciación de la masa de célula beta.

En este capítulo pretendemos dar un resumen general sobre el proceso de diferenciación de la célula beta durante la embriogénesis así como explicar a grandes rasgos como se regula la masa de célula beta en el individuo adulto y cuales son los procesos de regeneración que tienen lugar en determinadas situaciones fisiopatológicas.

1. Morfogénesis del páncreas

Los tres linajes celulares (exocrino, endocrino y ductal) que forman el páncreas adulto proceden de un grupo común de células precursoras de origen endodérmico. El conocimiento de los factores y de los mecanismos de señalización implicados en el proceso de diferenciación pancreática constituye un reto complejo pero a la vez fascinante de la biología del desarrollo. Además, muchos investigadores buscan pistas en el área del desarrollo pancreático que puedan ser útiles para el diseño de protocolos de generación de células productoras de insulina a partir de fuentes celulares renovables como las células madre.

La formación del páncreas se inicia de manera temprana durante el desarrollo embrionario. En el ratón, la primera indicación visual de morfogénesis pancreática se da alrededor del día embrionario 9 (e9), cuando dos rudimentos, uno dorsal primero y otro ventral después, se hacen visibles en la zona del endodermo del intestino primitivo que dará lugar al duodeno. Hacia el día 10.5 se inicia el crecimiento

y ramificación del epitelio de los dos primordios pancreáticos, los cuales entre e13 y e14 sufren una reorientación y se fusionan en un único órgano bipolar.

La diferenciación endocrina es aparente desde las etapas más iniciales del desarrollo pancreático. Entre e9.5 y e12.5 la mayoría de células formadas son positivas para glucagón. A partir de e12.5 se produce la diferenciación exponencial de células endocrinas, en su mayoría células beta, a partir de precursores (neogénesis) en la etapa conocida como transición secundaria. Hacia el día e16 las células endocrinas empiezan a agruparse, pero no es hasta poco antes de nacer (e18-e19) que los islotes están plenamente formados. La maduración final del islote se da durante las primeras semanas después del nacimiento. El páncreas exocrino empieza a diferenciarse hacia el día e14.5 y en el día e15.5 los acinos ya son claramente distinguibles de los ductos. Por el contrario, se conoce muy poco sobre la diferenciación de las células ductales, a excepción de que la mayoría de precursores ductales se distinguen de los progenitores de los linajes endocrino/exocrino antes de e12.5.

En humanos, los primordios pancreáticos son evidentes en la semana 4 de gestación y su fusión se produce al final de la semana 6. Células endocrinas positivas para las cuatro hormonas insulares están presentes ya en la semana 10. Cabe destacar que existen pocos estudios moleculares sobre organogénesis pancreática en humanos y los modelos vigentes y descritos a continuación se basan mayoritariamente en información obtenida en ratón y pollo.

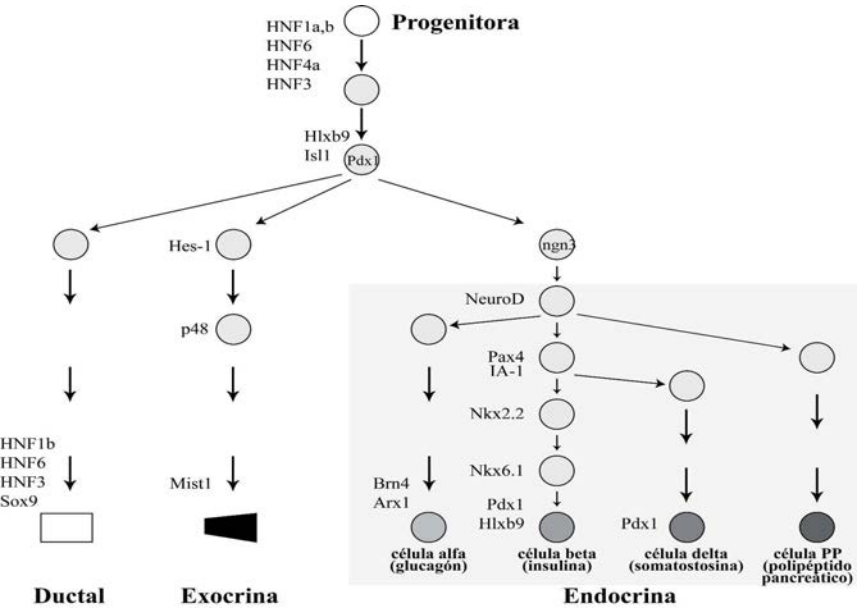
2. Control transcripcional del desarrollo pancreático endocrino

Desde un punto de vista molecular, la expansión y diferenciación de los precursores endodérmicos hacia los distintos linajes pancreáticos son el resultado de una secuencia altamente regulada de señales extracelulares y de cambios en programas de expresión génica. Dichos cambios son dirigidos por una cascada de factores de transcripción cuyas activaciones-inactivaciones coordinadas permiten la progresión del precursor pluripotente a la célula pancreática diferenciada. La identificación de estos factores y de las relaciones epistáticas existentes entre ellos es indispensable para llegar a comprender los procesos que culminan en la formación de las células del islote. En muchos casos, proteínas ya conocidas debido a su papel en el mante-

nimiento del fenotipo de la célula endocrina diferenciada han resultado ser cruciales para el desarrollo de este mismo tipo celular durante la embriogénesis. Por ejemplo, factores reguladores del gen de la insulina como Pdx-1 o NeuroD/BETA2 son clave para el desarrollo endocrino y/o pancreático. La información obtenida mediante técnicas de biología molecular clásica y, en especial, mediante el estudio de modelos genéticos en ratón ha permitido elaborar la cascada de factores de transcripción propuesta en la Figura 1. No obstante, se trata de un modelo aún incompleto y posiblemente mucho más simple de lo que ocurre en la realidad. Por ejemplo, muchos de los factores enumerados actúan en más de un momento del desarrollo y con funciones marcadamente distintas en cada uno de dichos momentos.

Los factores Pdx-1 y Hb9 se expresan en el endodermo prepancreático antes de que se inicie la formación de los primordios. En ausencia de Hb9 no se forma el primordio dorsal pero sí el ventral. En cambio, en ausencia de Pdx-1 se inicia la formación de ambos primordios pero su crecimiento y morfogénesis queda interrumpida en las etapas más tempranas del desarrollo, tanto en ratones como en humanos. La importancia de Pdx-1 en el desarrollo pancreático ha sido confirmada en

FIGURA 1



estudios recientes de linaje celular que han demostrado que todas las células pancreáticas derivan de células positivas para Pdx-1. La expresión de Pdx-1 y Hb9 decae después de e10.5 pero vuelve a reaparecer en las células beta ya diferenciadas.

La especificación del linaje endocrino en precursores pancreáticos viene determinada por la expresión de los factores de transcripción pro-endocrinos. Esta terminología hace referencia a (1) el requerimiento de estos factores para iniciar la cascada de diferenciación endocrina y (2) su capacidad para inducir diferenciación endocrina en contextos adecuados. Neurogenina3 (Ngn3) es el factor pro-endocrino clave en el páncreas. Ratones genoanulados para el gen que codifica este factor no tienen células endocrinas en el páncreas y mueren poco después de nacer, lo que demuestra que Ngn3 ejerce una función no redundante en la diferenciación endocrina. Ngn3 actúa a modo de interruptor de la cascada transcripcional que culmina en la formación de las células endocrinas del islote. No obstante, su expresión es transitoria y después de alcanzar un punto máximo alrededor de e15.5 decae hasta niveles indetectables en el páncreas neonato. Por lo tanto, otros factores, activados directa o indirectamente por Ngn3, deben continuar y finalizar el proceso de diferenciación endocrina iniciado por Ngn3. Uno de estos factores es NeuroD/BETA2. NeuroD1/BETA2 es una diana directa de Ngn3 y comparte con su activador la capacidad de promover el destino endocrino en ambientes permisivos. A parte de NeuroD1/BETA2, otros factores regulados directamente por Ngn3 y de demostrada relevancia en la formación de las células endocrinas del islote son Pax4, Nkx2.2 e IA-1 (para revisiones extensas sobre los factores de transcripción endocrinos, ver bibliografía recomendada).

Una cuestión de gran interés, si deseamos aplicar los conocimientos sobre biología del desarrollo al diseño de protocolos de generación de células beta, la determinación del subtipo específico (alfa, beta, delta o PP) de los precursores endocrinos. La identificación de células que coexpresan insulina y glucagón en las etapas tempranas del desarrollo pancreático sugirió la existencia de células progenitoras bipotenciales para los linajes alfa/beta. No obstante, esta idea fue desestimada tras demostrarse que las células beta maduras derivan de células que nunca expresaron glucagón, y viceversa. El conjunto de datos disponibles hasta el momento sugiere que la decisión sobre el subtipo endocrino se toma en etapas iniciales del proceso de diferenciación y antes de la expresión de hormonas. El modelo vigente establece que la acción concertada de distintos factores de transcripción, que funcionan en paralelo

con Ngn3 o por debajo de la misma, es la responsable de determinación de linaje endocrino específico. Así, Pax4 y Arx son necesarios para la especificación de los linajes beta y alfa, respectivamente. La ausencia simultánea de los dos factores resulta en la pérdida total de células beta y alfa y en el aumento de células delta. También los factores Nkx2.2 y Nkx6.1 juegan un papel relevante en la determinación del linaje beta. Animales genoanulados para Nkx2.2 no tienen células positivas para insulina pero sin embargo tienen células endocrinas con otros marcadores de células beta y expresan la hormona grelina. La ausencia de Nkx6.1, por su parte, es la causa de que no se produzca neogénesis de células beta durante la transición secundaria.

3. Señalización y desarrollo pancreático

El estudio de las redes genéticas es esencial para comprender los cambios de fenotipos celulares que ocurren durante el proceso de diferenciación. Sin embargo, estas redes no pueden explicar por sí solas el desarrollo pancreático. Efectivamente, la formación del páncreas requiere una serie de señales inductivas, unas iniciales y otras secundarias, procedentes de tejidos vecinos que dirijan su diferenciación.

Para la correcta formación del páncreas son necesarias señales enviadas por tejidos mesodérmicos situados cerca del endodermo prepancreático. El notocordio envía señales que reprimen la expresión de Sonic Hedgehog (Shh) en el endodermo prepancreático dorsal, lo que constituye un prerequisite para la expresión de Pdx-1 en esta región y para el consiguiente desarrollo del páncreas. La activina-b, perteneciente a la familia de TGF β (factor de crecimiento transformante beta) y el FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos 2) son dos de las moléculas secretadas por el notocordio y mediadoras de dicho efecto. La especificación del páncreas ventral ocurre de manera independiente. Pdx-1 se expresa en el endodermo ventral y las señales procedentes del mesodermo cardíaco y del septum transversum no son necesarias para inducir la expresión de este factor en la región prepancreática sino para inhibir su expresión en la región prehepática. El mismo FGF2 o BMP4 (proteína morfogénica ósea 4), otro miembro de la familia TGF-beta, son dos de las moléculas encargadas de inhibir la expresión de Pdx-1 en la región prehepática permitiendo así el desarrollo del hígado. Por lo tanto, los mismos morfógenos se encargarían de la inducción del páncreas dorsal y ventral pero con estrategias esencialmente opuestas.

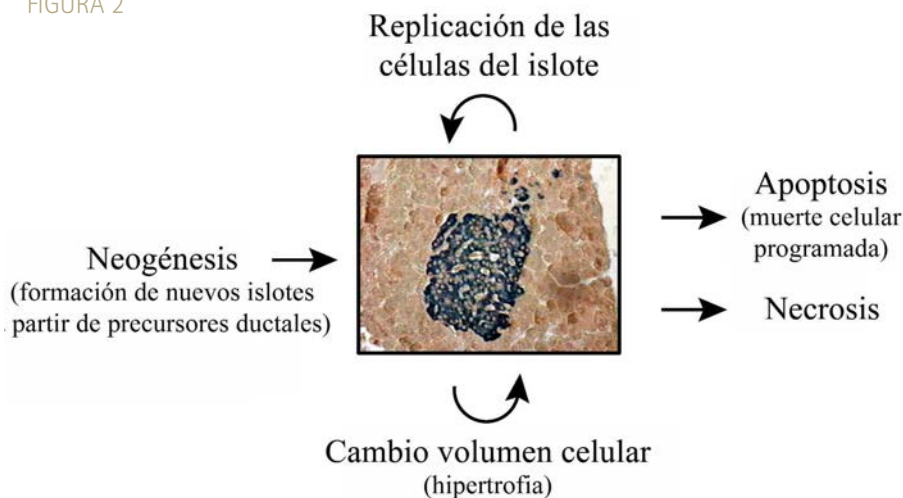
La interacción con vasos sanguíneos es también crítica para la diferenciación del páncreas. Estudios *in vitro* han demostrado que señales procedentes del endotelio de la aorta son necesarias para inducir la expresión de Pdx-1 e insulina en el endodermo prepancreático dorsal. Las moléculas mediadoras de dicho efecto incluyen miembros de la familia FGF.

Una vez iniciada la formación de los primordios, la proliferación y morfogénesis del epitelio pancreático depende de señales procedentes del mesénquima circundante. Se postula que estas señales son determinantes para establecer la proporción de tejido exocrino versus endocrino del páncreas. Experimentos en cultivo celular demuestran que el mesénquima es necesario para la estimulación del crecimiento epitelial y de la diferenciación exocrina. Uno de las moléculas candidatas secretadas por el mesénquima y que podría participar en la inducción del destino exocrino es la folistatina. Esta molécula actuaría uniéndose a miembros de la familia TGF β como la activina o los BMPs y inhibiendo su acción. De hecho, moléculas de la familia de TGF- β se expresan en el epitelio pancreático y suprimen el desarrollo exocrino en etapas tempranas del desarrollo.

4. El páncreas endocrino, un órgano en constante renovación

Respecto al individuo adulto, en los últimos años ha cambiado sustancialmente la concepción científica que tenemos del funcionamiento de la masa de célula beta. Se ha pasado de considerarse un órgano estático a uno dinámico y plástico. La plasticidad endocrina se puede definir como la capacidad que tiene este órgano para regular la masa de célula beta según las necesidades de insulina y poder así garantizar un óptimo control de la glucemia. Esta plasticidad celular implica tanto un capacidad de expansión como de disminución de la masa de célula beta. El páncreas endocrino está en continua remodelación mediante un proceso dinámico, en el cual participan tanto la regeneración como la muerte celular (ver figura 2). Existen numerosos factores genéticos, metabólicos y ambientales que afectan este proceso de remodelación. El balance entre los diferentes mecanismos que controlan la masa de célula beta permiten que ésta se adapte a las necesidades metabólicas de diferentes situaciones como el embarazo o la obesidad. Aunque se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la home-

FIGURA 2



ostasis de célula beta, aun existen muchas lagunas y controversias científicas.

Los mecanismos de adaptación de la célula beta funcional, aunque son diversos, no son mutuamente excluyentes y pueden actuar simultáneamente. Tanto la involución como la expansión de la célula beta no sólo conlleva cambios en el número de células, sino también en el tamaño celular mediante el aumento (hipertrofia) o disminución (atrofia) del volumen celular. Además de estos mecanismos compensatorios, que actúan a medio o largo plazo, no debemos olvidar que existen otros mecanismos a corto plazo que permiten adaptar la funcionalidad de la célula beta a las variaciones en las necesidades metabólicas del organismo. Por ejemplo, la célula beta puede aumentar su capacidad de secretar insulina usando una gran variedad de complejos mecanismos como un aumento en la síntesis o secreción de insulina o la variación del umbral de respuesta a los diferentes estímulos.

En referencia a los mecanismos que controlan la masa de célula beta, el número absoluto de células beta puede aumentar mediante dos mecanismos: replicación y neogénesis. La replicación consiste en la división de una célula beta funcional para obtener dos nuevas células beta. En el islote se ha postulado que existen diferentes tipos de célula beta: el pool replicativo y el pool senescente. El primero incluye las células beta capaces de dividirse por mitosis en respuesta a diferentes factores de

crecimiento; el segundo pool se refiere a las células beta funcionales incapaces de replicarse. Sin embargo, esta teoría ha sido rebatida en estudios recientes que demuestran que, en el ratón adulto, todas las células beta comparten esta capacidad replicativa y, por tanto, participan de igual manera en el mantenimiento de la masa celular beta. Por otra parte, la neogénesis se refiere a la formación de nuevas células beta a partir de precursores no endocrinos; el proceso requiere la proliferación de estos precursores y una posterior diferenciación de estos hacia células beta funcionales. La naturaleza de estos precursores no ha sido determinada con claridad, pero diferentes estudios sugieren que se encontrarían en el ducto pancreático y serían de origen epitelial. La importancia de la neogénesis en la homeostasis de la masa de célula beta en el adulto no está clara siendo ésta un tema muy controvertido en la comunidad científica.

El aumento en la masa de célula beta producido por replicación o neogénesis puede ser contrareestado por la disminución del número celular mediante la muerte celular por apoptosis o necrosis. La apoptosis o muerte celular programada permite moldear el tejido pancreático durante la organogénesis y la vida del individuo; además juega un papel fundamental en modular la expansión y posterior involución de la masa de célula beta en la diabetes tipo 2. Por lo tanto, la regulación de la homeostasis de la masa de célula beta es un proceso complejo y genéticamente heterogéneo. La contribución relativa de los diferentes mecanismos de expansión e involución puede variar de manera considerable, incluso en el mismo individuo, cuando cambian las condiciones fisiológicas.

5. Crecimiento del páncreas posnatal

En los roedores, justo después del nacimiento, la replicación se convierte en el principal mecanismo de aumento de masa de célula beta, aunque la neogénesis continúa produciéndose. De hecho, se han identificado células ductales alrededor de los islotes neonatales con una alta tasa de replicación que darían lugar a células beta funcionales después de su diferenciación. No obstante, estas estructuras desaparecen después de la primera semana de vida de los roedores. El aumento de masa de célula beta mediante replicación y neogénesis dura hasta el destete de los animales. Justo en este momento se produce un pico de apoptosis que está asociado a la disminución de la tasa de crecimiento que se produce a partir de este momento. En la

actualidad no existen evidencias de neogénesis a partir de precursores celulares en el páncreas intacto de roedores adultos.

Durante este periodo neonatal y en el momento del destete, se produce un remodelado del páncreas endocrino que es fundamental para la maduración de la célula beta y que permite su correcto funcionamiento y respuesta a los principales secretagogos. Esta maduración tiene lugar mediante los cambios que se producen en los procesos de replicación y neogénesis, así como los apoptóticos, durante las primeras semanas de vida del animal. Se sabe en la actualidad que una incorrecta maduración de la célula beta durante este periodo incrementa las probabilidades de desarrollar diabetes o intolerancia a la glucosa en la madurez. Alteraciones en la dieta tanto durante el embarazo como durante la lactancia modifican la maduración de la célula beta y podrían tener consecuencias a largo plazo amenazando la capacidad homeostática del páncreas endocrino.

Una vez se produce el destete, como se ha mencionado anteriormente, el ritmo de crecimiento de la masa de célula beta disminuye significativamente. No obstante, el páncreas continua comportándose como un órgano dinámico pero con una tasa de crecimiento mucho menor. La masa total de célula beta aumenta significativamente hasta los 20 meses de edad en las ratas. Por ejemplo durante los seis primeros meses de vida se produce un incremento de unas cuatro veces en la masa de célula beta. Mediante estudios morfológicos se ha determinado la tasa de replicación de la célula beta, la cual disminuye del 4% por día en animales jóvenes (1 mes de edad) hasta valores menores al 0.5% en ratas adultas. En humanos, la tasa de replicación en el adulto es parecida a la de las ratas adultas. El incremento de masa se debe a un aumento del tamaño de los islotes y de la célula beta, y no a la formación de nuevos islotes. Esta hiperplasia e hipertrofia del islote se produce hasta los diez meses de vida de la rata. A partir de entonces sólo se produce un aumento en el tamaño de la célula beta.

Para determinar si realmente tiene lugar la neogénesis en el adulto, se han realizado estudios de linaje celular utilizando ratones modificados genéticamente que permiten determinar la procedencia de las células divididas independientemente del momento en el que se produce la división. Estos estudios demostraron que a partir de los dos meses de edad, las nuevas células beta formadas provienen de células ya existentes del islote que expresaban insulina. Por lo tanto, concluyeron que en el adulto el aumento de masa de célula beta se produce exclusivamente por la replica-

ción de células beta preexistentes en el islote y que la neogénesis a partir de precursores ductales no tiene lugar. No obstante, no podemos olvidar que estos estudios han sido realizados en modelos animales y las diferencias entre ratones y humanos puede modificar la posible contribución de la neogénesis en la homeostasis de la masa de célula beta. Por ejemplo, en el páncreas humano existe una población de células beta aisladas, fuera del islote, distribuidas por el tejido exocrino, esta población celular es casi inexistente en roedores. Estos datos morfológicos pueden sugerir que la neogénesis sí que tiene lugar en los humanos.

6. Regeneración del páncreas adulto.

El páncreas, a diferencia de otros órganos, tiene una capacidad regenerativa muy limitada. Esto se debe probablemente a una baja tasa de replicación o a la dificultad de activar la neogénesis. Sin embargo, en determinadas situaciones se ha podido estimular la capacidad regenerativa del páncreas. En todos los modelos en los cuales se ha estudiado la capacidad regenerativa del páncreas, se ha inducido un daño en el tejido pancreático ya sea mediante tóxicos químicos o por cirugía. El daño químico se produce mediante la administración de estreptozocina o aloxano, dos drogas que selectivamente destruyen la célula beta. Para los modelos con daño por cirugía, se puede utilizar una pancreatectomía parcial (70%) o subtotal (90-95%), o una ligación del ducto. En este último caso se produce una destrucción e inflamación de una parte del páncreas debido a la liberación de los productos de secreción exocrinos.

En todos los casos, después del daño en el tejido se produce un aumento en la capacidad mitótica del páncreas produciéndose una regeneración parcial del páncreas endocrino y exocrino. A diferencia del hígado, que tiene una alta capacidad regenerativa, en estos modelos la recuperación nunca es total. Dependiendo del modelo utilizado, en algunos casos se observa un aumento en el ritmo de replicación de la célula beta indicando que esta regeneración endocrina se produce por un aumento de la replicación, de manera parecida a lo observado en el aumento fisiológico que se produce durante el crecimiento del adulto. No obstante, en otros casos se observa un aumento en la tasa de replicación de los ductos pancreáticos y se observa expresión de Pdx-1 e insulina en estas células ductales. Esto sugiere, que en estos casos, la regeneración se produce por una activación de la neogénesis mediante la

activación de células precursoras o stem cells. Los resultados indican que estas células se diferenciarían a célula beta utilizando los mismos mecanismos moleculares que tienen lugar durante la embriogénesis.

Además se ha demostrado que existen sustancias capaces de estimular e procesos regenerativos cuando se administran a estos modelos animales. La administración de GLP-1 a animales pancreatectomizados estimula la regeneración del páncreas mediante la expansión de la célula beta tanto por replicación como por neogénesis. La betacelulina, un factor de crecimiento de la familia de los EFGs (factores de crecimiento epidermal) promueve la regeneración de la célula beta tanto en ratas pancreatectomizadas como en ratones prefundidos con aloxano. También la combinación de diferentes factores, como por ejemplo gastrina y EGF, inducen el aumento de célula beta en ratones tratados con aloxano o en ratones con una ligación en el ducto. En este último caso la regeneración se produce principalmente por la estimulación de los mecanismos neogénicos.

7. Conclusiones

En resumen, el estudio de los procesos de diferenciación y regeneración son de gran utilidad para entender las señales que controlan positiva y negativamente el crecimiento de la célula beta. En los últimos años se ha abierto una nueva aproximación terapéutica a la diabetes con el objetivo de mantener la masa de célula beta mediante la estimulación de su regeneración, ya sea por aumento en el ritmo de replicación o por inducción de la diferenciación de las células ductales. Esperemos que un futuro no muy lejano ésta nos ofrezca la posibilidad de curar la diabetes, o sino, por lo menos mejorar considerablemente la calidad de vida de los pacientes diabéticos.

8. Bibliografía seleccionada

Bonner-Weir S (2000) Life and death of the pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol. Metab.* 11:375-378.

Bouwens L y Rooman I (2005) Regulation of pancreatic Beta-Cell Mass. *Physiological Reviews* 85:1255-1270.

Cleaver O y Melton D (2003) Endothelial signalling during development. *Nature Medicine* 9: 661-668

Del Prato S, Wishner WJ, Gromada J y Schluchter BJ (2004) B-cell mass plasticity in type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 6:319-331.

Dor Y, Brown J, Martinez OI y Melton DA (2004) Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429:41-46.

Wilson ME, Scheel D, German MS (2003). Gene expression cascades in pancreatic development. *Mechanisms of Development* 120:65-80.

Jensen J (2004) Gene regulatory factors in pancreatic development. *Developmental Dynamics* 229: 176-200.

Brennand K, Huangfu D y Melton D (2007) All beta cells contribute equally to islet growth and maintenance. *Plos Biol* 5:e163.

Jensen J (2004) Gene regulatory factors in pancreatic development. *Developmental Dynamics* 229: 176-200.

Kim SK y MacDonald RG (2002) Signaling and transcriptional control of pancreatic development. *Curr Opin Genet Dev* 12:540-547.

Wilson ME, Scheel D y German MS (2003). Gene expression cascades in pancreatic development. *Mechanisms of Development* 120:65-80.

CAPÍTULO 9

Células Troncales en el Tratamiento de la Diabetes

AUTORES

Franz Martín
Pilar Vaca
Bernat Soria

Centro andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa,
Universidad Pablo Olavide, Sevilla

1. Introducción

Desde el año 1922, fecha en la que empezaron los primeros tratamientos con éxito de la diabetes, hasta la actualidad, la principal aproximación terapéutica para la diabetes tipo 1 ha sido el tratamiento de los síntomas mediante la inyección de insulina. Recientemente, el llamado protocolo de Edmonton ha modificado este panorama, gracias al avance significativo llevado a cabo en las técnicas de transplante de islotes humano, los cuales han permitido tener pacientes diabéticos tipo 1 libres de las inyecciones de insulina. Sin embargo, la aplicación de este tratamiento es de momento bastante restrictiva debido a la falta de donantes humanos. No obstante, los éxitos prometedores de esta terapia de sustitución de las células beta dañadas por células sanas procedentes de donantes cadavéricos, unido a la carencia de donantes, ha reactivado con gran fuerza la búsqueda de substitutos de células beta capaces de restaurar la función pancreática. Esto es lo que se conoce con el nombre de terapia celular de la diabetes.

En esta revisión se tratará de describir la situación actual de este campo. Se abordará el concepto de célula troncal (también llamada célula madre), se mencionarán los distintos tipos de células troncales que se podrían usar para la terapia celular de la diabetes y se comentarán los éxitos y problemas que han ido surgiendo en estos últimos años en la búsqueda de células que se puedan trasplantar. Hay que señalar que el fin último de la terapia celular es conseguir la curación de la enfermedad. Es decir, que los pacientes tengan valores de glucemia normales sin necesidad de la administración de insulina.

2. Concepto de célula troncal y clasificación de las mismas

A pesar de la creciente cantidad de estudios sobre el origen y las propiedades de las células troncales, todavía hoy en día no existe una definición universalmente aceptada de ellas. En principio, se definen por una serie de características que las hacen distintas del resto de las células. Dentro de ellas, las mas evidentes y sobre las que se asienta la base de la definición mas común de las células troncales es que son un grupo de células que forman clones, los cuales son capaces de auto regenerarse y diferenciarse en múltiples tipos de tejidos, aunque no pueden formar total-

mente un nuevo ser vivo (Figura 1). La primera propiedad supone la capacidad de dividirse de un modo continuo y prácticamente ilimitado, dando lugar a hijas que son exactamente iguales a la madre. La segunda característica, la pluripotencialidad, indica la capacidad de diferenciarse a cualquier tipo o linaje celular del organismo. Estas dos características son las que les confieren el tremendo potencial de aplicación clínica que tienen estas células, ya que supondrían una fuente ilimitada de células que se podrían trasplantar en los ensayos de terapia celular. Por último, tal y como se ha señalado, estas dos propiedades no son en sí mismo totalmente definitorias de todos los tipos de células troncales existentes.

Las células troncales se pueden clasificar sobre la base de su grado de pluripotencialidad o diferenciación y según su origen. No obstante, ambas clasificaciones están relacionadas, ya que según su origen tendrán mayor o menor capacidad de diferenciación. En función de su capacidad de diferenciarse hacia distintos tipos de tejidos, las células troncales se pueden clasificarse en: i) totipotenciales; ii) pluripotenciales; iii) multipotenciales y iv) unipotenciales.

El primer grupo se trata de células troncales capaces de diferenciarse hacia cualquier tipo celular, incluyendo el trofoblasto que dará lugar a la placenta, los tejidos extraembrionarios y el cordón umbilical. Este tipo de células solo están presentes en el embrión en los primeros estadios de división (aproximadamente hasta la etapa de 8-16 células).

Las células pluripotentes son aquellas que pueden dar lugar a los distintos tipos celulares que proceden de las tres hojas embrionarias, incluyendo la línea germinal (óvulos y espermatozoides). Dentro de este grupo se encuentran las células troncales embrionarias y las células troncales germinales. Las primeras proceden de embriones antes de su implantación que se encuentran en la fase de blastocisto. En ellos hay una masa de unas 130 células, que se encuentran en su interior, y que se denominan masa celular interna. Esta masa celular cuando se aísla y se consiguen cultivar origina a las células troncales embrionarias. Las células troncales germinales derivan de las células germinales primordiales, procedentes de las futuras gónadas, que en un embrión humano se desarrollan entre las semanas cinco y nueve del desarrollo. Por último, en los últimos seis años han ido apareciendo una serie de estudios que sugieren que en los tejidos adultos existen células troncales con una capacidad de crecimiento y diferenciación mayor de lo que se pensaba, es decir, células troncales pluripotentes. Hasta ahora se han sugerido cuatro tejidos distintos

en donde podrían encontrarse esas células: i) el mesangioblasto; ii) la dermis; iii) el tejido muscular y la médula ósea. Lo que no se tiene claro es cuales son los posibles orígenes de estas células.

Las células multipotentes son células mas comprometidas, presentes en tejidos adultos, que pueden derivar a los distintos tipos de células que se encuentran en un tejido determinado u órgano. Por ejemplo, las células troncales del epitelio intestinal que darán lugar a los cuatro tipos de células que forman parte del mismo.

Finalmente, las células unipotentes son líneas celulares bastante comprometidas que se diferencian en un único tipo celular.

3. Posibles fuentes de células troncales que pueden utilizarse para generar células productoras de insulina.

Hasta el momento, los diferentes estudios publicados han mostrado la posibilidad de obtener células productoras de insulina a partir de distintos tipo de células troncales, tanto de origen embrionario como adulto (Figura 2). A continuación, discutiremos los avances obtenidos en la investigación con ambas fuentes de células troncales.

3.1. Células troncales embrionarias

Los primeros estudios que establecían la posibilidad de utilizar células troncales embrionarias, de origen murino y humano, como una fuente de células productora de insulina aparecían a comienzos del año 2000. Las células que se obtenían contenían insulina, la secretaban de un modo regular en respuesta a estímulos, y en el caso de las troncales embrionarias de ratón, eran incluso capaces de normalizar la glucemia cuando se trasplantaban a modelos de ratones diabéticos.

Las estrategias que se han empleado hasta ahora para diferenciar las células troncales embrionarias son dos. La primera de ellas utiliza un sistema que permite seleccionar las células productoras de insulina gracias a su resistencia a un antibiótico. Para ello se inserta en las células troncales indiferenciadas un transgén que hace que

todas las células que estén expresando el gen de la insulina sean resistentes a un antibiótico. A continuación, las células troncales embrionarias que han incorporado el transgén en su genoma se someten a varios protocolos de diferenciación. Estos procesos consisten en cultivar las células en presencia de distintos factores de crecimiento, nutrientes y otros factores, con el fin de forzarlas a producir insulina. Generalmente, los protocolos de diferenciación se diseñan en base a los conocimientos que nos proporciona la biología del desarrollo del páncreas. Es decir, tratan de emplear factores que se saben que son claves en los diversos estadios del desarrollo pancreático. Posteriormente, las células diferenciadas se someten al proceso de selección con el antibiótico, para tener en el medio de cultivo solo las células que producen insulina. A continuación, esas células diferenciadas y seleccionadas se caracterizan. En el proceso de caracterización se busca la presencia de elementos claves, propios de las células beta nativas, y que son fundamentales para una secreción regulada de insulina. En este sentido se busca la presencia del transportador de glucosa (Glut-2), del poro del canal de potasio dependiente de ATP (Kir 6.2), del receptor de sulfonilureas (Sur1), de la insulina, del péptido C y del factor de transcripción homeobox-1 pancreático duodenal (PDX1). La presencia de todos estos elementos se estudia a nivel del mensajero, así como, de la proteína. Posteriormente, se hacen pruebas de la funcionalidad de las células diferenciadas analizándose la secreción regulada de insulina y péptido C. También, se estudia la funcionalidad del canal de potasio dependiente de ATP. Finalmente, se comprueba en modelos de animales diabéticos si estas células son capaces de restaurar la normoglucemia, tanto en situaciones de ayuno, como postpandriales. Dentro de este primer tipo de estrategia, también se pueden seleccionar las células en función de la expresión de un factor de transcripción denominado NKx6.1, el cual está involucrado en los pasos finales de la diferenciación hacia célula beta pancreática durante el desarrollo embrionario.

La segunda estrategia consiste en inducir en las células troncales indiferenciadas una expresión elevada de determinados factores de transcripción, que son importantes en los procesos de especificación hacia célula beta pancreática durante el desarrollo embrionario. Dentro de estos factores cabe destacar los estudios llevados a cabo aumentando la expresión de Pax4 y de Pdx1. Pax4 es importante en la diferenciación hacia célula beta pancreática, una vez que ya existe una célula progenitora propia que dará lugar a una célula beta pancreática. Pdx1 es un factor de transcripción fundamental para el desarrollo del páncreas y para el mantenimiento del fenotipo de la célula beta pancreática adulta. Hay que señalar que esta estrategia de

incremento de la expresión de los factores de transcripción, también suele ir acompañada de manipulaciones en las condiciones de cultivo, con el fin de forzar aún más la diferenciación hacia una célula productora de insulina.

En cuanto a los trabajos llevados a cabo con células troncales embrionarias humanas, las investigaciones realizadas van por detrás. En este sentido, los protocolos de diferenciación desarrollados han sido capaces de producir células que expresan a nivel del ARN mensajero varios marcadores propios de una célula beta. Además, estas células también contienen insulina, péptido C, así como, otras hormonas presentes en los islotes. Por otro lado, son capaces de liberar insulina en respuestas a secretagogos que no se metabolizan, pero muestran una liberación de insulina en respuesta a glucosa muy pobre. Finalmente, todavía no se ha podido demostrar que sean capaces de normalizar la glucemia cuando se trasplantan a modelos de animales diabéticos. De momento, la falta de éxito en estas primeras aproximaciones ha hecho que se vuelva la vista hacia el estudio de lo que ocurre durante el desarrollo embrionario. Concretamente, es importante entender que es lo que pasa en los primeros pasos de la formación del endodermo, ya que es fundamental diseñar protocolos de diferenciación que nos permitan dirigir a las células troncales embrionarias hacia endodermo definitivo.

3.2. Células troncales adultas

Hasta el momento, las fuentes de células troncales adultas utilizadas para obtener células productoras de insulina tienen un doble origen: i) pancreáticas y ii) extra-pancreáticas.

Durante las últimas dos décadas, varios estudios han señalado que en el páncreas existen varias fuentes de células progenitoras con un potencial de diferenciación restringido hacia células de fenotipo pancreático. De hecho, se sabe que hay procesos de regeneración pancreática, pero no está claro si estos se deben a la autorreplificación de las propias células beta o a la formación de nuevas células beta a partir de células troncales adultas. Además, hasta hoy día, los estudios realizados no han sido capaces de identificar realmente cual es la célula troncal adulta pancreática responsable de la regeneración pancreática. Probablemente, el problema sea que la regeneración pancreática no se deba a una única estirpe celular o a un solo proceso de reparación, sino que participen tanto células beta adultas que se replican, como distintos tipos de células troncales adultas. De hecho, cada día que pasa crece más

la lista de células troncales adultas pancreáticas propuestas como candidatas para la regeneración pancreática. Hasta el momento tenemos: i) células ductales; ii) células del tejido exocrino pancreático; iii) células progenitoras derivadas de los islotes y positivas a nestina; iv) células positivas a neurogenina 3; v) células precursoras multipotentes derivadas del páncreas y vi) células beta maduras.

Más recientemente han comenzado a publicarse trabajos donde se sugiere la existencia de células troncales adultas que están fuera del páncreas y que pueden dar lugar a células productoras de insulina. Por ejemplo, debido a que el páncreas y el hígado comparten un origen embrionario endodérmico común, este fue uno de los primeros lugares donde se buscó para encontrar estas células. Se vio que en células troncales adultas hepáticas de ratones y en células progenitoras hepáticas presentes en hígados fetales humanos, la activación del factor de transcripción Pdx1 inducía la expresión de varios genes propios de células beta, producía la liberación de insulina en respuesta a glucosa y cuando se trasplantaban estas células en modelos de animales diabético e inmunodeficientes, restauraban y mantenían la normoglucemia por períodos de tiempo prolongados. Otro tejido con un origen embriológico similar es el intestino delgado. Hay un estudio donde se demuestra que células troncales adultas intestinales de rata, a las que se les induce la expresión de los factores de transcripción Pdx1 e Isl1 y se las cultiva en presencia de factores que promueven la diferenciación hacia célula beta, producen insulina y disminuyen la glucemia cuando se trasplantan a ratas diabéticas. Uno de los tejidos donde se encuentran células troncales adultas con una enorme plasticidad es la médula ósea. Se ha comprobado que estas células, denominadas células progenitoras adultas multipotentes, son capaces de transdiferenciarse hacia destinos ectodérmicos, mesodérmicos y endodérmicos. Un estudio reciente indica que células troncales adultas procedentes de la médula ósea son capaces de generar, aunque con bastante limitación, células pancreáticas endocrinas funcionales. También, existe otro trabajo donde se comprueba que el trasplante de células troncales procedentes de la médula ósea reduce la hiperglucemia en ratones diabéticos. Los mecanismos propuestos para explicar estos trabajos son dos: i) existe una diferenciación de las células troncales de la médula ósea en el interior de los islotes y los ductos pancreáticos y ii) el trasplante de estas células de la médula ósea promueve la regeneración endógena del tejido pancreático. Junto con la médula ósea, la sangre periférica es otra de las fuentes propuestas para la obtención de células troncales adultas con posibilidad de transformarse en células productoras de insulina. Un estudio publicado el año pasado comprobaba la enorme plasticidad de monocitos obtenidos de sangre periférica de

donantes humanos. Estos monocitos eran forzados a transdiferenciarse a células productoras de insulina, las cuales tenían una secreción de insulina regulada por glucosa, e incluso disminuían la glucemia durante una semana, cuando se trasplantaban a ratones inmunodeprimidos y diabéticos. Finalmente, se sabe que células troncales obtenidas de determinadas regiones del cerebro son capaces de cultivarse y crecer in vitro, así como de transdiferenciarse a distintos linajes celulares. En este sentido, se demostró hace dos años que a las células troncales adultas procedentes de cerebros de rata se las podía inducir a expresar el gen de la insulina. Además, estas células secretaban insulina y respondían metabolitamente a nutrientes y sulfonilureas.

Así pues, en los últimos años se ha demostrado la posibilidad de utilizar distintas fuentes de células troncales para la obtención de células productoras de insulina. A modo de resumen, los caminos por los que estos diferentes tipos de células troncales pueden llegar hasta una célula capaz de liberar insulina de un modo regulado son varios (Figura 3): i) replicación de células beta adultas preexistentes; ii) diferenciación a partir de células troncales embrionarias; iii) diferenciación a partir de células troncales adultas pancreáticas y iv) transdiferenciación a partir de células troncales adultas extrapancreáticas.

4. Perspectivas de la terapia celular de la diabetes mellitus

Una pregunta que cabría plantearse es cuales son los requerimientos mínimos que debe tener cualquier sustituto de los islotes de Langerhans, si se quiere usar en la terapia celular de la diabetes mellitus. El primero de ellos es el número de células necesarias. Actualmente, los protocolos de trasplante de islotes humanos usan aproximadamente 1×10^6 islotes por receptor. Esto equivale a transplantar de $2-4 \times 10^9$ células beta. Si multiplicamos esa cantidad, por ejemplo, por el número de receptores potenciales de trasplante con diabetes tipo 1 (hasta 10^5 personas en España), la magnitud del problema es evidente. Por lo tanto, debido a la enorme cantidad de células que se necesitaría estas tendrían que obtenerse a partir de una fuente de células troncales que tuvieran una gran capacidad de proliferación in vitro, antes de poder diferenciarlas. En este sentido, las células troncales embrionarias serían candidatas más atractivas que las adultas, dado que poseen una mayor

capacidad de proliferación. El segundo requisito es que las células que se trasplantan tienen que tener la capacidad de sintetizar, almacenar y liberar insulina cuando sea necesario, es decir en respuesta a los cambios de la glucemia. Para ello las células beta han desarrollado mecanismos complejos que les permiten monitorizar y responder, de un modo constante y rápido, a las modificaciones en los valores circulantes de los nutrientes. La complejidad de estos mecanismos hace que las células troncales adultas de origen pancreático pueda ser la fuente más idónea, ya que la distancia que las separa a ellas de las células beta es más corta, por lo que el desarrollo de protocolos de diferenciación debe ser teóricamente más sencillo. En tercer lugar, la capacidad de proliferación de las células que se vayan a trasplantar tiene que estar estrictamente controlada, con el fin de evitar la formación de tumores. Por esta razón, las células troncales adultas serían mejores, pues tienen una menor capacidad de formar tumores que las embrionarias. También, las células trasplantadas deben evitar la destrucción inmunológica por parte del receptor. Según se publicó hace unos años, la capacidad inmunogénica de las células troncales embrionarias es bastante limitada, por lo que serían mejores candidatos. Por último, hay un problema añadido en el trasplante a pacientes con diabetes tipo 1, dado que su sistema inmune está programado para destruir a toda las células beta primarias. Por eso, pudiera ocurrir que las células secretoras de insulina que se diferencian a partir de células troncales embrionarias obtenidas por procesos de clonación terapéutica, de un paciente con diabetes tipo 1, fueran rechazadas. Una alternativa sería generar células secretoras de insulina que tuvieran los elementos esenciales para poder liberar insulina en respuesta a nutrientes, pero que fueran, en el sentido inmunológico y de la biología del desarrollo, distintas de las células beta primarias. Por último, es importante que las células productoras de insulina que se generen estén diseñadas para poder funcionar en un ambiente fuera del páncreas, ya que los lugares de trasplante utilizados hasta ahora están fuera del mismo.

5. Conclusiones

Gracias al avance producido por el protocolo de Edmontón y los pasos de gigante que se han dado en la investigación de la biología básica de las células troncales, la terapia celular se podrá convertir en un futuro próximo en un tratamiento más de la diabetes mellitus. En este sentido, las células troncales ofrecen un enorme potencial. Los caminos que se están siguiendo actualmente, con el fin de generar sufi-

cientes células productoras de insulina que se puedan transplantar y suplir la deficiencia de células beta son muchos. Entre ellos destacan la expansión de las células beta primarias, la utilización de células troncales embrionarias, el empleo de células progenitoras pancreáticas y la transdiferenciación de células troncales adultas no pancreáticas. Aunque todas estas opciones son prometedoras, también plantean un grado de dificultad y un reto enorme para la comunidad científica. De momento, ninguno de los caminos propuestos es claramente mejor que el otro. Por eso, deberían dejarse todas las puertas abiertas y apostar por la investigación en todas estas líneas, así como, por la interacción que habrá entre ellas.

6. Bibliografía seleccionada

Berná G, León-Quinto T, Enseñat-Waser R, Montanya E, Martín F, Soria B. Stem cells and diabetes. *Biomed Pharmacother.* 2001; 55: 206-212.

Bonner-Weir S, Weir GC. New sources of pancreatic beta cells. *Nat Biotechnol.* 2005; 857-861.

Burns CJ, Persaud SJ, Jones PM. Stem cell therapy for diabetes: do we need to make beta cells?. *J Endocrinol.* 2004; 183: 437-443.

Colman A. Making new beta cells from stem cells. *Semin Cell Dev Biol.* 2004; 15: 337-345.

Halban PA. Cellular sources of new pancreatic beta cells and therapeutic implications for regenerative medicine. *Nat Cell Biol.* 2004; 6: 1021-1025.

Montanya E. Islet- and stem-cell-based tissue engineering in diabetes. *Curr Opin Biotech.* 2004; 15: 435-440.

Soria B, Andreu E, Berná G, Fuentes E, Gil A, León-Quinto T, Martín F, Montanya E, Nadal A, Reig JA, Ripoll C, Roche E, Sanchez-Andrés JV, Segura J. Engineering pancreatic islets. *Pflügers Archiv.* 2000; 440: 1-18.

Soria B, Bedoya FJ, Martín F. Gastrointestinal stem cells: Pancreatic stem cells. *Am J Physiol.* 2006; 289: G177-G180.

Soria B, Real FX, Martín F. From stem cells to B-cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2001; 44: 407-415.

Soria B. In vitro differentiation of pancreatic beta cells. *Differentiation.* 2001; 68: 215-219.

Weir GC. Can we make surrogate beta cells better than the original?. *Semin Cell Dev Biol.* 2004; 15: 347-357.

FIGURA 1

Esquema representativo de las dos propiedades más importantes de las células madre

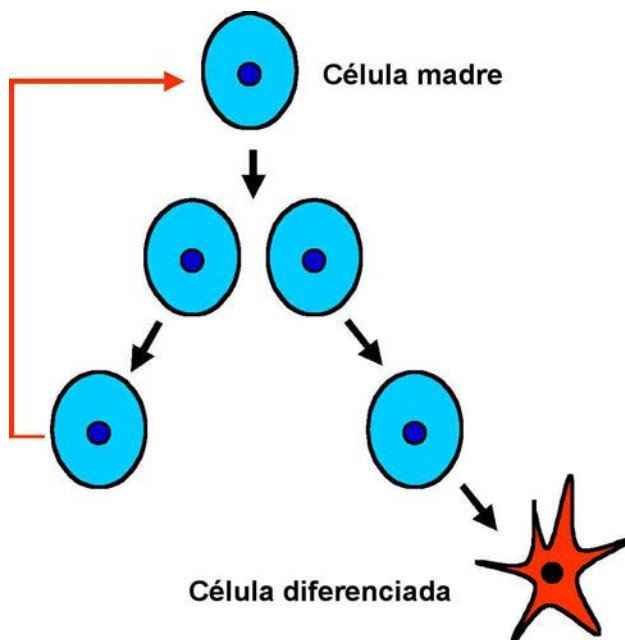
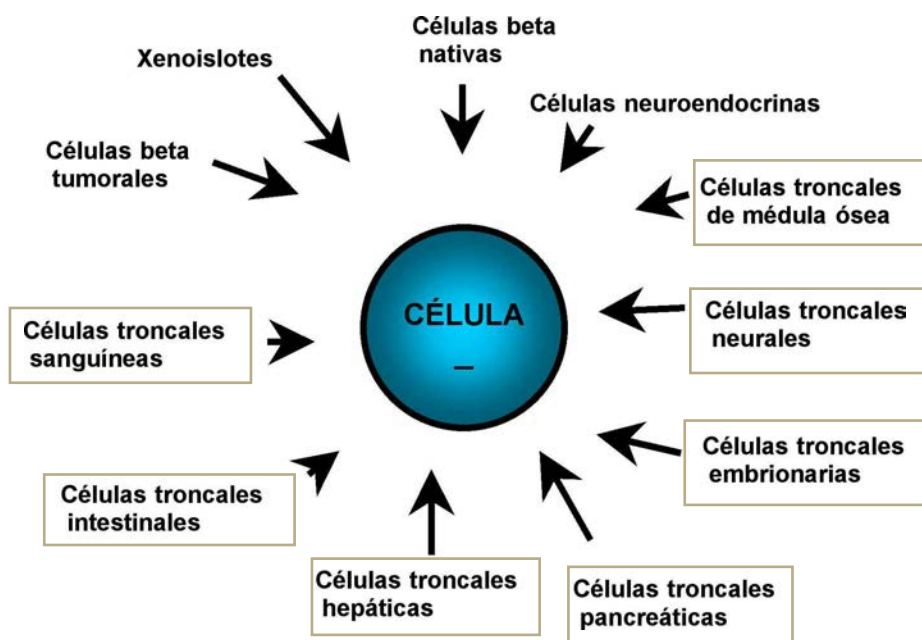
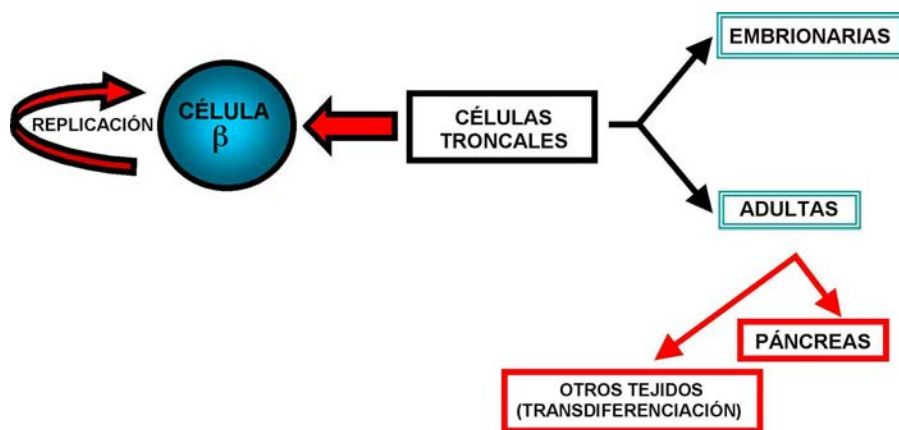


FIGURA 2



Tipos celulares empleados para la terapia celular de la diabetes. En esta figura se representan las distintas fuentes de células utilizadas hasta hoy como tejido productor de insulina y cuyas aplicaciones en la terapia celular de la diabetes se están investigando. Enmarcadas en rojo aparecen los distintos tipos de células troncales usados.

FIGURA 3



Mecanismos posibles de obtención de nuevas células beta. A) Replicación de células beta adultas preexistentes, B) Diferenciación a partir de células troncales embrionarias; C) Diferenciación a partir de células troncales adultas pancreáticas y iv) Transdiferenciación a partir de células troncales adultas extrapancreáticas.

La monografía que presentamos ofrece al lector interesado, pero no necesariamente especializado, una visión actual del papel fundamental del islote pancreático en la etiopatogenia y tratamiento de la diabetes. Los capítulos de la monografía reflejan la diversidad y complementariedad de las líneas de investigación de los miembros del Grupo de Islotes de la SED. En un entorno en el que la interrelación entre investigadores es fundamental, el Grupo de Islotes ofrece un foro de comunicación, intercambio y participación entre profesionales de ámbitos distintos que a menudo es difícil encontrar en otros entornos, e incorpora, a partir del nexo común que significa el interés por el islote pancreático y la diabetes, perfiles profesionales y áreas de conocimiento diversos que van de la investigación básica y preclínica a la clínica, como queda reflejado en este libro. Es el deseo de los miembros del Grupo de Islotes que hemos participado en su elaboración, que la monografía sea de utilidad para facilitar una mejor comprensión del papel central del islote pancreático en el desarrollo de la diabetes, y al mismo tiempo acerque de una forma rigurosa pero comprensible las aportaciones al tratamiento de la diabetes de la investigación en islote pancreático.

Eduard Montanya Mias

