



Efectos de la administración de un análogo del GLP-1 sobre las células endocrinas del páncreas

Géraldine Joanny Ordóñez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA
Facultat de Medicina
Departament de Ciències Clíniques

Efectos de la administración de un análogo del GLP-1 sobre las células
endocrinas del páncreas

Géraldine Joanny Ordóñez

2011

Programa: Fisiología

Bienio: 2006-2008

Directores: Eduard Montanya y Noèlia Téllez

Programa de Fisiologia
Bienio 2006-2008

Memoria presentada por la licenciada GÉRALDINE JOANNY ORDÓÑEZ
para optar al grado de doctora.

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Eduard Montanya i Mias y de la Dra. Noèlia Téllez i Besolí en el laboratorio de “Diabetis i Endocrinologia Experimental” del departamento de Ciències Clínicas de la Universitat de Barcelona en el Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL).

Géraldine Joanny Ordóñez

Dr. Eduard Montanya i Mias

Dra. Noèlia Téllez i Besolí

La investigación es un proceso largo y complejo que requiere la colaboración de todo un equipo sin el cual no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

Quisiera agradecer especialmente a:

Eduard Montanya, por haberme permitido formar parte de este grupo y haber confiado en mí para llevar a cabo este proyecto.

Noèlia Téllez, por todas las contribuciones que ha realizado desde el principio de este proyecto en aspectos tanto científicos como técnicos del estudio. Su capacidad de trabajo y amplia curiosidad científica merecen mi admiración más sincera. Para mí, no es sólo una gran profesional, de la que he podido aprender enormemente, sino también una gran amiga.

Jessi, por su más que cuidadosa labor técnica que ha sido imprescindible en muchos aspectos de este trabajo.

Kelly y Vero, por su excelente asistencia técnica.

Eli, por tenderme la mano siempre que lo he necesitado y por la bonita amistad que compartimos.

Al resto de compañeros del laboratorio, Silvia, Mónica, Marc, Montse, Ruben, Mar y Marina por el buen ambiente en el que se ha desarrollado nuestra tarea y por alguna que otra ayuda puntual.

Al personal del estabulario. Quisiera reconocer la labor de todo el personal y en especial la de Pedro en cuanto al especial cuidado que siempre tuvieron con mis animales de experimentación.

En un plano más personal quisiera mencionar a:

Eliane Hajnsdorf. Gracias a ella tuve mi primer contacto con la investigación y supo contagiarme su pasión por la ciencia. Si no fuera por ella nunca me hubiera lanzado a realizar esta tesis.

Marta, por mostrar su interés y apoyo al proyecto a pesar de no encontrarse en el laboratorio mientras éste se desarrollaba.

Mi familia, por haber estado a mi lado en todo momento y en especial a Bea por haberme ayudado en la etapa final con el formato de la tesis.

Aure, por apoyarme y animarme siempre.

Índice

ABREVIATURAS	15
RESUMEN	23
INTRODUCCIÓN	29
1. El páncreas y el islote	31
1.1 Insulina	32
1.2 Secreción de insulina	32
<i>1.2.1 Secreción de insulina estimulada por glucosa</i>	33
<i>1.2.2 Exocitosis de los gránulos de insulina</i>	34
1.3 Vascularización del islote	36
2. Regulación de la masa celular beta	38
2.1 Neogénesis de células beta	38
2.2 Replicación de las células beta	41
<i>2.2.1 Ciclo celular de las células beta</i>	43
<i>2.2.2 Eventos intracelulares que promueven replicación</i>	44
<i>2.2.3 Principales factores que modifican la expresión de ciclinas</i>	44
2.3 Cambios en el tamaño de las células beta	45
2.4 Muerte de las células beta	45
<i>2.4.1 Apoptosis</i>	46
<i>2.4.2 Necrosis</i>	46
3. Masa beta y Diabetes	48
3.1 Diabetes	48
<i>3.1.1 Patogenésis</i>	48
3.2 Terapias para la diabetes	50
<i>3.2.1 Regeneración de la masa beta existente</i>	51

3.2.2 Reposición de la masa beta	53
4. Péptido similar al glucagón 1 (GLP-1)	59
4.1. El péptido GLP-1	59
4.2 Efectos fisiológicos del GLP-1	61
4.1.2 Secreción de GLP-1	61
4.2.2 Efecto sobre las células beta pancreáticas	62
4.3 Señalización y receptor	68
4.3.1 El receptor de GLP-1	68
4.3.2 Desensibilización del GLP-1R	68
4.3.3 Expresión del GLP-1R	69
4.3.4 Señalización	70
4.4 Formas farmacológicas del GLP-1	74
4.5 Regulación de la masa beta y GLP-1	76
4.5.1 Efectos del GLP-1 in vitro	76
4.5.2 Efectos del GLP-1 o sus análogos sobre la masa beta de modelos murinos de diabetes	78
5. Referencias Bibliográficas	82
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	101
MATERIALES Y MÉTODOS	107
1. Diseño Experimental	109
1.1 Estudio 1: Efectos de la administración de un análogo del GLP-1 sobre ratas pancreatectomizadas al 95%	109
1.2 Estudio 2: Efectos de la administración de un análogo del GLP-1 sobre el transplante de islotes	110
1.2.1 Estudio 2: Efectos del análogo del GLP-1 sobre el transplante de islotes a medio plazo	110
1.2.2 Estudio 3: Efectos de la administración de un análogo del GLP-1 en los días inmediatos al transplante de islotes	111

2. Animales de experimentación	112
2.1 Inducción de la diabetes	113
2.2. Determinación de glucemia, peso e insulina plasmática	114
2.3 Administración de productos	115
2.3.1 <i>Vehículo</i>	115
2.3.2 <i>NN0027</i>	115
3. Procedimientos quirúrgicos	115
3.1 Pancreatectomía	115
3.2 Aislamiento de islotes	116
3.3 Transplante de islotes	116
3.4 Recuperación de las muestras de tejido	117
3.4.1 <i>Pancreatectomía</i>	117
3.4.2 <i>Transplante de islotes</i>	117
3.5 Fijación e inclusión de las muestras	118
4. Inmunohistoquímica	118
4.1 Replicación de las células beta	119
4.2 Apoptosis de las células beta	120
4.3 Área individual de las células beta	120
4.4 Masa de células beta	121
4.5 Neogénesis de células beta	122
4.6 Vascularización de los islotes	122
5. Análisis estadístico	123
6. Referencias bibliográficas	124
RESULTADOS	127
<u>1. Estudio 1: Efectos de la administración de un análogo del GLP-1</u>	

sobre ratas pancreatectomizadas al 95%	129
1.1 Evolución Metabólica	129
1.2 Replicación de las células beta	130
1.3 Neogénesis de células beta	131
1.4 Apoptosis de las células beta	132
1.5 Tamaño de las células beta	133
1.6 Masa de células beta	134
1.7 Vascularización de los islotes	134
2. Estudio 2: Efectos de la administración de un análogo del GLP-1 sobre el trasplante de islotes	137
2.1 Evolución metabólica	137
<i>2.1.1 Evolución metabólica de los animales diabéticos transplantados</i>	137
<i>2.1.2 Evolución metabólica de los animales normoglucémicos transplantados</i>	141
2.2 Replicación de las células beta	143
2.3 Apoptosis de las células beta	144
2.4 Masa de células beta	145
3. Estudio 3: Efectos de la administración de un análogo del GLP-1 sobre el trasplante de islotes a ratas diabéticas en los días inmediatos al trasplante	146
3.1 Evolución metabólica	146
3.2 Replicación de las células beta	147
3.3 Apoptosis de las células beta	147
3.4 Masa de células beta	148
DISCUSIÓN	151
CONCLUSIONES	177
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DURANTE EL TRASCURSO DE ESTA TESIS	181

Abreviaturas

A

AC: Adenilato Ciclasa
 ADP: Adenosina difosfato
 Akt: Proteína quinasa B inicialmente descrita como un oncogen de un retrovirus transformante en unos ratones transgénicos llamados AK.

AMPC: Adenosín Monofosfato cíclico
 APCs: Células presentadores de Antígeno
 ATP: Adenosina trifosfato
 ATPasa: Proteína que cataliza la degradación del ATP en ADP

B

BrdU: Bromodeoxiuridina
 BSA: Albumina Sérica Bovina

BTC: Betacelulina
 BMP: Proteína morfogenética del hueso

C

c-myc: Homólogo celular del oncogen vírico de la mielocitomatosis
 CaM: Calmodulina
 CBP: Proteína de unión a CREB
 CDK: Quinasa dependiente de ciclinas
 Células β TC6: Línea celular de insulinoma de ratón
 Células CAPAN 1: Línea celular de células ductales humanas
 Células CHO: Línea celular de ovario de hamster chino

Células MIN6: Línea celular de insulinoma de ratón
 CICR: Liberación de calcio inducida por calcio
 CIP/KIP: Familia de proteínas inhibidoras de quinasas o inhibidoras de quinasas dependientes de ciclinas
 CITR: Registro colaborativo de transplantes de islotes
 CRE: Elemento respuesta al AMPC
 CREB: Proteína de unión a CRE
 CTLA4: Proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos

D

DAB: Diaminobenzimida
 DNA: Acido desoxiribonucleíco

DPPIV: Dipeptidil Peptidasa IV

E

EGF: Factor de crecimiento epidérmico
 EGFR: Receptor de EGF
 EMA: Agencia Europea del Medicamento
 Epac: Factor de intercambio de nucleótidos de guanina dependiente de AMPC

ERK: Quinasa dependiente de señales extracelulares
 Ex-4: Exendina-4

F

FADH₂: Dinucleótido de Flavina Adenina reducido

FDA: Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de America (Food and Drug Administration)

FK506: Tacrolimus

Fox: Familia de factores de transcripción forkhead

FT: Factor de transcripción

G

GEF: Factor de intercambio de nucleótidos de guanina del inglés Guanine Nucleotide Exchange Factors

GH: Hormona del crecimiento

GI: Gastrointestinal

GIP: Polipéptido inhibitor gástrico también conocido como Péptidos insulíntrópico dependiente de glucosa

GLP-1: Péptido similar al glucagón 1 del inglés Glucagon-like peptide 1

GLP-1R: Receptor de GLP-1

GLUT-2: Proteína transportadora de glucosa 2

GPCR: Receptor acoplado a proteína G

GSK-3β: Glucogeno Sintasa Quinasa -3β

H

H89: N-[2-[[3-(4-Bromophenyl)-2-propenyl]amino]ethyl]-5-isoquinolinesulfonamida dihidrato dihydrochloro

HbA1C: Hemoglobina glicada

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

HLA: Antígeno leucocitario humano

I

IEQ: Islote equivalente

IFN-γ: Interferon γ

IGF: Factor de crecimiento similar a la insulina

IL: Interleuquina

INK: Proteína Inhibidora de quinasas

Células INS-1: Células de insulinoma de rata

IP3: Inositol tri-fosfato

IRS: Sustrato del receptor de insulina

J

JAK: Quinasa Janus

K

K_{ATP}: Canal de potasio (K⁺) dependiente de ATP

kDa: Kilodalton

Kir6.2: Canal de Potasio rectificador hacia dentro

Km: Constante de Michaelis

M

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos

MEK: Proteína fosforiladora de MAPK

mRNA: RNA mensajero

MT-Ex-4: Ratones transgénicos que expresan la exendina-4 en múltiples tejidos

mTOR: Proteína diana de la rapamicina en mamíferos

N

NADH: Dinucleótido de nicotinamida-adenina

NFAT: Factor nuclear de células T activadas

Ngn: Neurogenina

NO: Oxido Nítrico

NOD: Diabéticos no obesos

NSF: Factor soluble sensible a N-ethylmaleimida

P

PC: Prohormona Convertasa

PDK1: Quinasa 1 dependiente de fosfatidilinositol

PDX-1: Pancreatic Duodenal Homeobox 1

PG: Proglucagon

PI3K: Quinasa 3' fosfatidil inositol

PKA: Proteína quinasa A

PKB: Proteína quinasa B, también denominada Akt

PL: Lactógeno placentario

PNF: Pérdida de función primaria

PP: Polipéptido Pancreático

PP2B: Calcineurina

pRb: Proteína del Retinoblastoma

PRL: Prolactina

Proteína G: Proteína de unión a nucleótidos de guanina

PTB1: Proteína de unión de tracto de polipirimidina

PYY: Péptido pancreático YY

PX: Pancreatectomía

R

RNA: Acido ribonucleico

RRP: Gránulos de insulina listos para ser liberados

S

SD: Sprague-Dawley

Src: Familia de proteínas tirosina kinasas proto- oncogénicas relacionadas con fibrosarcoma.

SNAP: Proteína asociada al sinaptosoma

SNARE: Proteínas de adhesión a NSF soluble

SNP: Polimorfismo de un único nucleótido

STAT: Proteína transductora de señal y activadora de la transcripción

STZ: Estreptozotocina

SUR: Receptor de sulfonilureas

Abreviaturas

T

TCA: Ciclo del ácido tricarboxílico

TCF7L2: Factor de transcripción 7 similar al 2 también denominado TCF-4

TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante β 1

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TX: Trasplante de islotes

V

VAMP-2: Proteína 2 asociada a la membrana de la vesícula

VDCC: Canal de calcio dependiente de voltaje

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

W

Wnt: Subclase de ligandos morfogenéticos secretados que se descubrieron al estudiar los genes homólogos Wg (Wingless) e Int.

Z

ZDF: Rata Zucker diabética obesa

Resumen

Un aspecto central del desarrollo de la diabetes tanto de tipo 1 como de tipo 2 es la reducción en el número de células productoras de insulina. En la diabetes de tipo 1, la masa de células beta se pierde debido a la destrucción autoinmune de las células beta, mientras que en la diabetes de tipo 2 existe una alteración en la función beta que junto con la reducción parcial de la masa de células beta no permite hacer frente al aumento en la demanda metabólica generada por la resistencia a la insulina. Por tanto, los tratamientos que se proponen como potencialmente capaces de curar ambos tipos de diabetes son los que están destinados a restablecer o regenerar la masa beta.

En esta óptica nos hemos interesado por los agonistas del receptor de GLP-1. El GLP-1 es una potente hormona glucoreguladora producida por las células L enteroendocrinas en respuesta a la ingesta oral. En el páncreas, el GLP-1 actúa como una incretina estimulando la secreción de insulina en respuesta a la ingesta de forma dependiente de glucosa. Por otra parte, se ha descrito que el GLP-1 es también capaz de aumentar la masa beta insular estimulando la proliferación y la neogénesis de las células beta e inhibiendo su apoptosis.

Nuestro estudio describe los efectos *in vivo* de la administración de un análogo del GLP-1 sobre la regeneración de las células beta en la pancreatoclectomía subtotal y sobre la masa de células beta restablecida por trasplante de islotes.

La hipótesis básica del proyecto es que el análogo del GLP-1 es capaz de aumentar la masa beta insular tanto en una situación de regeneración como de sustitución de la masa beta.

El objetivo es caracterizar la acción del tratamiento con el análogo del GLP-1 y comprobar si la acción del análogo puede verse modificada según la estrategia elegida para restablecer la glucemia normal del animal. Los efectos de la administración del análogo del GLP-1 podrían verse afectados por la situación de los islotes, el contexto glucémico del animal o la presencia de inflamación.

En el presente estudio hemos demostrado que el tratamiento con el análogo del GLP-1 en dos modelos diferentes de deficiencia de masa beta tiene claros efectos sobre la regulación de la glucosa sanguínea y un efecto estimulador de la proliferación sobre las células beta. En las ratas pancreatoclectomizadas, el tratamiento con el análogo del GLP-1 evitó la aparición de hiperglucemia severa y aumentó la masa de células beta por aumento de neogénesis de células beta y proliferación de las mismas. En los animales transplantados los efectos fueron menos aparentes, aunque detectamos una tendencia a un mejor control metabólico y un discreto aumento de la replicación de las células beta en caso de los animales diabéticos. No se pudo demostrar protección frente a la apoptosis por el tratamiento con el GLP-1 en ninguno de nuestros grupos experimentales. En

Resumen

conjunto, los resultados muestran que los efectos de GLP-1 sobre la masa beta pueden ser diferentes dependiendo de las características y situación del receptor del tratamiento. En esta tesis se muestra que el mismo tratamiento puede incrementar de forma muy significativa la masa beta en modelos de regeneración en los que induce un aumento de la neogénesis y replicación beta, mientras que, en otros modelos como el trasplante de islotes, el efecto sobre la replicación fue muy escaso o inexistente, y no modificó la masa beta.

Introducción

1. El páncreas y el islote

El páncreas es un órgano glandular con función exocrina y endocrina. La parte exocrina del páncreas está constituida por células ductales y células acinares. Estas últimas secretan el jugo pancreático que es conducido hasta el intestino por los ductos pancreáticos, y que contribuye a la digestión de los alimentos. Por otra parte, la fracción endocrina del páncreas está constituida por los islotes de Langerhans. Los islotes son agrupaciones de células endocrinas esparcidas por la fracción exocrina del páncreas. Están formados por células α , productoras de glucagón; células β , productoras de insulina; células δ , productoras de somatostatina; células PP, productoras de polipéptido pancreático y células ϵ productoras de ghrelina. Estos diferentes tipos celulares se encuentran en distintas proporciones en los islotes pancreáticos, siendo las células beta productoras de insulina las que se encuentran de forma más abundante. En el caso de los roedores representan un 70-80% del islote y se sitúan en el centro de éste rodeadas por los demás tipos celulares. Las células alfa representarían un 8-12% del islote, las delta un 4-8% y las PP entre un 3 y un 4%.

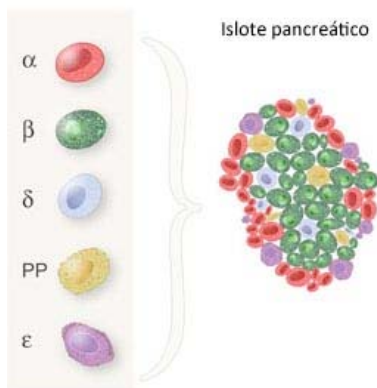


Figura 1: Ilustración esquemática de un islote de langerhans *adaptado de Beta Cell Consortium imagen de JP Cartailier*

La homeostasis de la glucosa en el organismo está controlada por las células endocrinas de los islotes. Estas células son capaces de detectar los niveles de glucosa en sangre y secretar hormonas en respuesta a estos. Cuando después de la ingesta de alimentos la concentración de glucosa en sangre aumenta, las células β secretan insulina para reducir los niveles de glucosa. La insulina estimula la captación de glucosa por las células del organismo y la conversión de glucosa a glicógeno en el hígado.

Introducción: 1. El páncreas y el islote

1.1 Insulina

El gen de la insulina se encuentra en los humanos en la región p15,5 del cromosoma 11 (Orci 1982) y consta de dos exones y dos intrones (Steiner, Chan et al. 1985). En el caso de los roedores existen dos genes que codifican para la proinsulina I y proinsulina II. En la rata estos dos genes se encuentran en el cromosoma 1 (Soares, Ishii et al. 1985). El promotor del gen de la insulina contiene varios tipos de secuencias donde se unirán diversos factores de transcripción (Melloul, Marshak et al. 2002), entre ellos el PDX-1 (Pancreatic Duodenal Homeobox 1). El transcrito de RNA tiene unos 1500 nucleótidos y los niveles de RNA están modulados por glucosa, AMPc y dexametasona además de otros sustratos como otros azúcares, nutrientes, aminoácidos, citoquinas e iones que también son capaces de regular la expresión del gen.

En situación fisiológica la regulación de la síntesis de insulina por glucosa se produce principalmente por control post-transcripcional del RNA y de la traducción a preproinsulina (Giddings, Chirgwin et al. 1982; Nielsen, Welsh et al. 1985; Weber, Zemelman et al. 1998).

La insulina se sintetiza en las células beta en forma de precursor, la preproinsulina. La preproinsulina se forma en el retículo endoplásmico rugoso y contiene un péptido señal que es escindido para formar la proinsulina en el polo cis del aparato de Golgi. Este péptido más estable pasa al polo trans del aparato de Golgi, donde se forman las vesículas de secreción (Rhodes 2000). En estos gránulos de secreción se llevará a cabo el procesamiento final de la proinsulina.

En primer lugar se producen dos cortes por las convertasas endopeptidasa 1 y 2 (Rhodes and Alarcón 1994) dando lugar a la insulina, de 6 kDa y al péptido C de 3 kDa. La insulina que se va produciendo precipita y forma cristales junto con las moléculas de zinc que se encuentran en el gránulo. La insulina precipitada quedará situada en el centro del gránulo mientras que el péptido C, más soluble quedará situado en la periferia.

Una vez maduro el gránulo de secreción migrará hacia la membrana plasmática guiado por los microtúbulos de la célula. El gránulo se fusionará a la membrana plasmática en un proceso en el que intervienen las proteínas SNARE de la maquinaria de fusión (Weber, Zemelman et al. 1998; Jahn and Südhof 1999). Los productos de secreción serán liberados al espacio extracelular en respuesta a estímulos muy finamente regulados.

1.2 Secreción de insulina

El citoplasma de las células beta contiene muchos gránulos secretores de insulina, unos 13.000 en ratón (Dean 1973). Cada gránulo contiene unas 200.000 moléculas de insulina cristalizadas

con átomos de Zn^{2+} . Solamente una pequeña proporción de estos gránulos participarán en la liberación de insulina estimulada por glucosa.

1.2.1 Secreción de insulina estimulada por glucosa

La glucosa entra en la célula beta a través del transportador GLUT-2 que, dada su baja especificidad y elevada capacidad puede acabar equilibrando las concentraciones de glucosa intracelulares y extracelulares.

Una vez en el interior de la célula, la glucosa es fosforilada a glucosa-6-fosfato por una isoforma de la hexoquinasa de elevada K_m , la glucoquinasa, lo que constituye un paso limitante para la progresión de glucólisis (Matschinsky 1996).

La glucólisis tiene como producto final en las células beta el piruvato ya que al haber bajas cantidades de lactato deshidrogenasa en este tipo celular existe poca conversión de piruvato a lactato.

El enzima lactato deshidrogenasa, que es esencial para la oxidación del NADH generado por la glucólisis en estas células, es compensado por transportadores de protones anclados en la membrana mitocondrial (transportador de glicerofosfato y el de malato/aspartato). Este último pasa los electrones del NADH de la glucólisis citosólica al malato que será reoxidado a oxalacetato en la matriz mitocondrial. El bloqueo de ambos inhibe la secreción de insulina inducida por glucosa (Eto, Tsubamoto et al. 1999). La estrecha dependencia entre la secreción y los transportadores explica la coordinación entre glucólisis y metabolismo mitocondrial en las células beta (Newgard and McGarry 1995).

En la mitocondria, el piruvato se convierte a acetilCoA mediante la piruvato deshidrogenasa o a oxalacetato mediante la piruvato carboxilasa y se inicia el ciclo de Krebs. En el ciclo se generan equivalentes reducidos NADH y $FADH_2$ que transfieren electrones a la cadena respiratoria provocando la hiperpolarización del potencial de la membrana de la mitocondria ($\Delta\Psi_m$) lo que estimula la entrada de Ca^{2+} . Los niveles de Ca^{2+} son suficientes para activar las deshidrogenasas generadoras de NADH (Rutter, Burnett et al. 1996). De esta manera el aumento de Ca^{2+} citosólico durante la estimulación de la secreción de insulina por glucosa se transfiere a la mitocondria facilitando la producción de NADH y otros factores que participan en la estimulación (Maechler, Carobbio et al. 2006).

El ATP formado a partir de fosforilación oxidativa pasa al citosol. La mayor parte de este sirve para mantener la homeostasis iónica de la célula, ya que la entrada y salida de iones está controlada

Introducción: 1. El páncreas y el islote

por bombas de iones que consumen ATP o por ATPasas. La ATPasa Na^+/K^+ controla el gradiente de Na^+ (10 veces inferior en el interior) y el de K^+ (20 veces superior en el interior).

La membrana plasmática de la célula beta en ayunas (5.5 mM de glucosa) se encuentra polarizada (-70mV la parte interior negativa). Este estado se mantiene por la salida de K^+ a través del canal de K^+ sensible a ATP (K_{ATP}). Este canal está formado por las subunidades kir6.2 con receptores sulfonilureas y SUR1. Cuando incrementa la concentración de glucosa intracelular, aumenta la relación ATP/ADP debido a la salida de ATP generado por la fosforilación oxidativa, lo que provoca el cierre de K_{ATP} y la despolarización de la membrana. Las sulfonilureas (antidiabéticos) imitan este proceso uniéndose a SUR1 y provocando el cierre del canal, en cambio el diazóxido inhibe este proceso abriendo los canales de K_{ATP} (Miki, Nagashima et al. 1999).

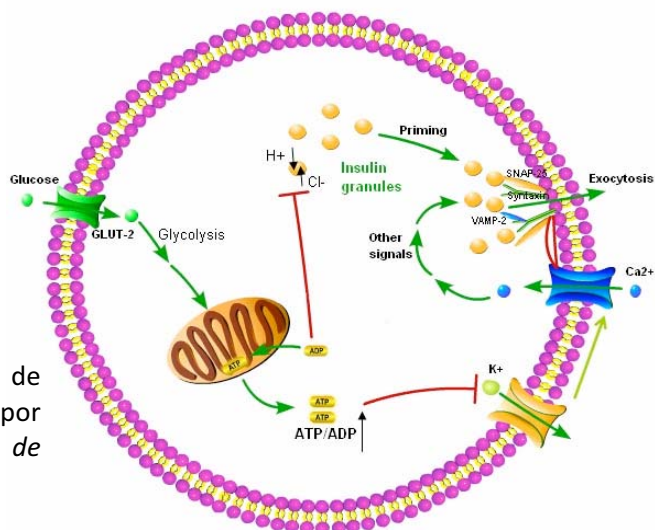


Figura 4: Secreción de insulina estimulada por glucosa. Adaptado de (Ren, Jin et al. 2007)

El cierre de K_{ATP} es clave para que se produzca el aumento del Ca^{2+} citosólico ya que la despolarización estimula la apertura de los canales de Ca^{2+} de tipo L, activos cuando el potencial de membrana se encuentra entre -40 y 0 mV. Los patrones globales del potencial de membrana, del Ca^{2+} citosólico y de la secreción tienen una respuesta bifásica a la estimulación por glucosa, con una primera fase transitoria que dura pocos minutos y otra fase sostenida (Bergsten 1995). El bloqueo de los canales de Ca^{2+} de tipo L suprime ambas fases de la secreción mientras que la estimulación de estos aumentan la secreción, indicando la importancia del aumento de Ca^{2+} citosólico en el proceso.

1.2.2 Exocitosis de los gránulos de insulina

Antes del proceso, los gránulos deben ser transportados desde el depósito intracelular a la membrana plasmática. La célula beta está polarizada y los gránulos son enviados a una localización

concreta mediante la interacción con los microtúbulos y los microfilamentos del citoesqueleto (Kelly 1990).

La insulina es secretada mediante exocitosis regulada. En la célula beta la presencia de señales intracelulares, como el aumento de calcio citosólico y las proteínas del gránulo secretor, del citosol y de la membrana plasmática estimularán la exocitosis de la insulina. La exocitosis implica el acoplamiento de los gránulos secretores a la membrana y la consiguiente fusión. Según el modelo SNARE, el acoplamiento entre el gránulo y la membrana sucede por interacción de v-SNARE (vesicle-soluble N-ethylmaleimide attachment protein receptor) de las vesículas con las t-SNARE (target-soluble N-ethylmaleimide attachment protein receptor) de la membrana plasmática. El conjunto de las proteínas v-SNARE está formado por sinaptobrevinas entre las que se encuentra VAMP-2 (vesicle associated membrane protein 2). Por otra parte las sintaxinas y la proteína SNAP-25 (synaptosome-associated protein 25) forman parte de las t-SNARE. La interacción de la proteína VAMP-2 presente en el gránulo, con las proteínas presentes en la membrana sintaxina y SNAP-25 permite al gránulo secretor anclarse a la membrana plasmática. El complejo formado por v-SNARE y t-SNARE actúa como receptor de α -SNAP, presente en célula beta. Su interacción permite la asociación de NSF (N-ethylmaleimide sensitive factor) al complejo formando la combinación VAMP/sintaxina/SNAP-25/ α -SNAP/NSF. La actividad ATPasa intrínseca de la NSF cataliza la hidrólisis de ATP provocando la disociación del complejo y promoviendo la fusión de la membrana del gránulo con la citoplasmática para permitir la liberación del contenido del gránulo al espacio extracelular.

Aunque la participación de las SNARE en la exocitosis de la insulina sea central, las proteínas SNARE no son las responsables del control del proceso sino que serán otros factores los que regularán el mecanismo de exocitosis. Por ejemplo, las sinaptotagminas, proteínas que también se encuentran en el gránulo secretor, actúan como sensores del calcio favoreciendo o impidiendo la formación del complejo v-SNARE/t-SNARE según la concentración de Ca^{2+} citosólico. Así pues concentraciones bajas de calcio intracelular favorecen la unión de la sinaptotagmina al complejo VAMP/SNAP-25 impidiendo el acoplamiento de α -SNAP. En cambio, un aumento de calcio provocará la disociación de la sinaptotagmina del complejo. De esta manera α -SNAP/NSF se unirá a VAMP/sintaxina/SNAP-25 formándose el complejo VAMP/sintaxina/SNAP-25/ α -SNAP /NSF y causando la fusión del gránulo a la membrana plasmática y la liberación de la insulina al exterior de la célula (Südhof 1995).

Introducción: 1. El páncreas y el islote

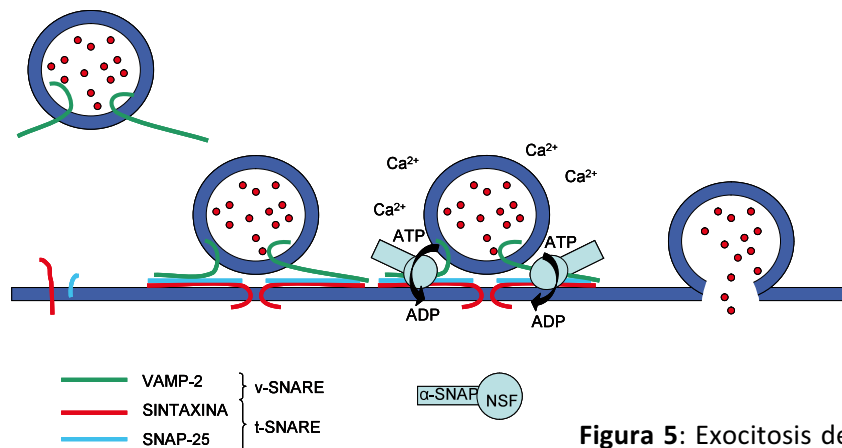


Figura 5: Exocitosis del gránulo de insulina

1.3 Vascularización del islote

Las venas y arterias que llegan al páncreas se van subdividiendo en vénulas y arteriolas que desembocan en los islotes pancreáticos donde finalmente forman los capilares. El intercambio de nutrientes, hormonas y productos de excreción de los islotes tiene lugar en los capilares.

El páncreas endocrino, que solamente representa un 1% de la masa del páncreas recibe un aporte sanguíneo que corresponde al 5-15% de todo el órgano (Jansson and Carlsson 2002). Los islotes reciben una abundante microcirculación, con un flujo sanguíneo 10 veces superior al del torrente sanguíneo lo que permite la regulación de su función y la liberación de forma muy rápida de las hormonas secretadas en sangre.

Todos los islotes del páncreas están conectados en paralelo a la red arterial, lo que asegura que están expuestos a los mismos estímulos hormonales y nutricionales.

Los islotes pancreáticos presentan una densa red de capilares sinusoidales morfológicamente similares a los glomérulos renales. Los islotes más grandes reciben sangre de una a tres arteriolas aferentes mientras que los capilares de los islotes más pequeños parecen estar integrados al sistema capilar exocrino. Las células beta están dispuestas de manera polarizada, con 8-10 células orientadas con su ápice hacia un capilar. Esta organización implica que cada célula beta está situada a una célula de distancia de la sangre arterial. Los capilares de los islotes son muy permeables al paso de moléculas ya que están altamente fenestrados, unas diez veces más que las células endoteliales del tejido exocrino (Olsson and Carlsson 2006).

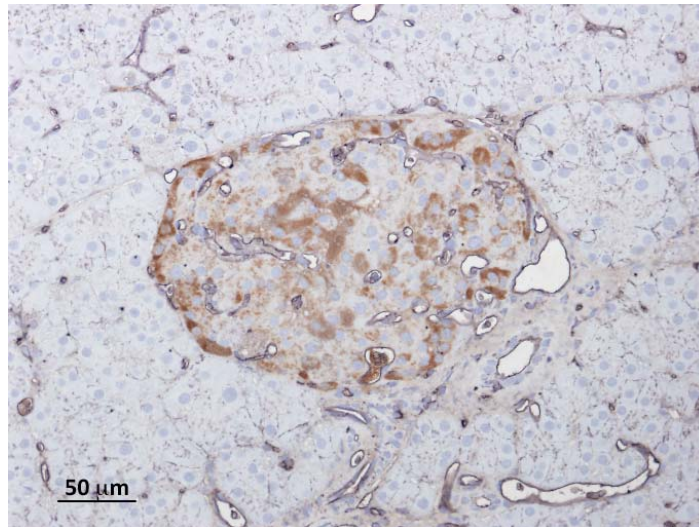


Figura 6: Micrografía de la vascularización de un islote de un páncreas de rata control. La tinción marrón corresponde a las células insulares y la negra a los vasos sanguíneos.

La microcirculación dentro del islote sigue siendo objeto de debate a día de hoy y existen tres teorías enfrentadas sobre como fluye la sangre al interior del islote. La hipótesis más aceptada propone que el flujo sanguíneo perfunde primero las células beta del islote, que estarían situadas al centro del islote para luego perfundir las demás células endocrinas. La segunda hipótesis propone que la circulación se hace de manera inversa. La tercera teoría es que la sangre entra al islote por un polo arterial, alimentando a todas las células endocrinas de ese polo, sin importar de que clase sean y que sale por el polo venoso del islote, alimentando por ultimo a las células endocrinas situadas más cerca de ese polo (Ballian and Brunicardi 2007).

La angiogénesis de los islotes durante el desarrollo embrionario o postnatal es crítica para la formación normal de los islotes. Además, se ha sugerido que puede estar relacionada con los procesos de hiperplasia o neoplasia de los islotes. Durante el desarrollo postnatal en roedores, el rápido crecimiento de los islotes coincide con una marcada proliferación de las células endoteliales y una mayor densidad vascular. Las células endocrinas se desarrollan de forma adyacente a los vasos sanguíneos, lo que hace intuir que los productos de secreción de las células endoteliales son requeridos para el desarrollo normal de las células endocrinas (Johansson, Andersson et al. 2006). Hay evidencias de que la secreción de factor de crecimiento del endotelio vascular de tipo A (VEGF-A) y de insulina por parte de las células beta podría estar involucrada en la angiogénesis de los islotes (Lammert, Gu et al. 2003).

Introducción: 2. Regulación de la masa celular beta

2. Regulación de la masa celular beta

El páncreas endocrino está en continua remodelación mediante un proceso dinámico, en el cual participan tanto la regeneración como la muerte celular. Existen numerosos factores genéticos, metabólicos y ambientales que afectan este proceso de remodelación. El balance entre los diferentes mecanismos que controlan la masa de células beta permite que ésta se adapte a las necesidades metabólicas.

Los cambios en la masa beta se pueden producir por cambios en el tamaño de células o bien por cambios en el número de células. El número absoluto de células beta puede aumentar mediante dos mecanismos: replicación y neogénesis (Bonner-Weir and Weir 2005) .

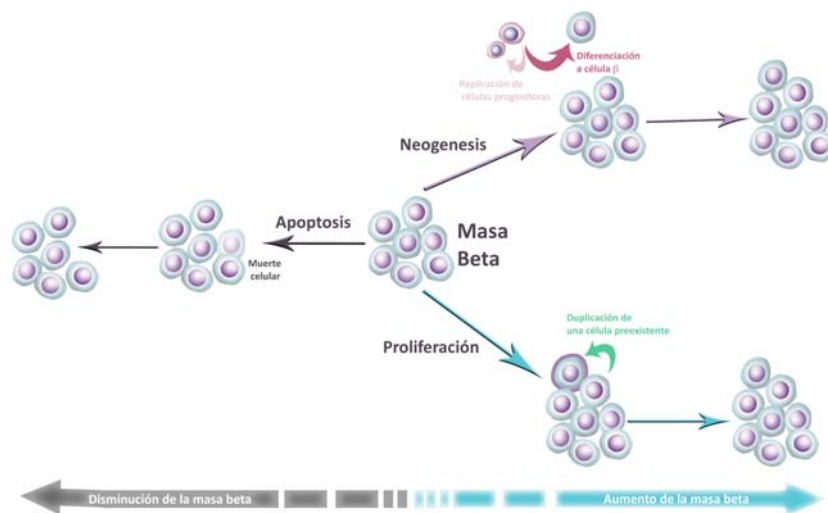


Figura 7: Equilibrio dinámico de la masa beta

2.1 Neogénesis de células beta

La neogénesis consiste en la formación de nuevas células β a partir de precursores no endocrinos. Durante el desarrollo embrionario la expansión de la masa beta se produce principalmente por neogénesis. En cambio, en el adulto es un proceso que se produce con una frecuencia más baja.

La naturaleza de los precursores adultos no ha sido determinada con claridad, pero diferentes estudios sugieren que se encontrarían en el ducto pancreático y serían de origen epitelial (Suzuki, Nakauchi et al. 2004).

Se ha propuesto que las células del epitelio ductal son capaces de regresar a un estado progenitor menos diferenciado que podría dar lugar a nuevos islotes o acinos (Bonner-Weir and Weir 2005). Esta hipótesis está basada en los estudios en ratas pancreatectomizadas al 90%, un modelo de

Introducción: 2. Regulación de la masa celular beta

regeneración bien establecido en el que la regeneración se produce por replicación de las células endocrinas y exocrinas preexistentes y proliferación de los ductulos y su posterior diferenciación en nuevos lóbulos pancreáticos indistinguibles de los preexistentes. Cuando las células ductales empiezan a replicarse, empiezan a expresar el factor de transcripción PDX-1, un FT expresado ampliamente en el páncreas embrionario pero que en el adulto se encuentra restringido a las células endocrinas β y δ (Bonner-Weir, Toschi et al. 2004). Los autores hipotetizan que una célula ductal madura con capacidad replicativa rápida puede asumir de forma transitoria un fenotipo menos diferenciado y menos restrictivo que le permite rediferenciarse en otro tipo celular pancreático. Esta plasticidad implicaría la posibilidad de que existan abundantes progenitores multipotentes en los ductos pancreáticos adultos que participan a la regeneración y que podría estimularse farmacológicamente.

Bonner- Weir y colaboradores han confirmado recientemente su hipótesis de que las células ductales constituyen los progenitores de los islotes nuevamente formados con un estudio de trazado de linaje celular en el que estudian el destino de las células que expresan la anhidrasa carbónica II (CAII) (Inada, Nienaber et al. 2008). Demuestran que las células con marcaje, bajo el promotor de CAII son capaces de formar islotes y tejido exocrino tanto en la edad adulta como en situación de daño por ligadura de ducto principal.

Una variación de esta hipótesis es la defendida por Bouwens y colaboradores, que proponen como modelo la transdiferenciación de las células acinares a islotes. En el modelo experimental de ligadura de ducto, que consiste en obstruir el ducto principal pancreático con una sutura se describieron evidencias de neogénesis de células beta a partir de células ductales y/o células acinares. Como consecuencia de la obstrucción del ducto los productos de la secreción exocrina se filtran al espacio intersticial provocando daño tisular e inflamación. La porción pancreática situada por debajo de la ligadura no se ve afectada y continúa funcionando con normalidad. Durante la primera semana se produce un aumento de células beta en la parte ligada que en parte provienen de neogénesis como lo sugieren los fenotipos intermedios entre célula ductal y endocrina (Wang, Kloppel et al. 1995) o bien entre célula acinar y endocrina (Bertelli and Bendayan 1997; Lardon, Huyens et al. 2004).

Un reciente estudio del grupo de Ferrer ha cuestionado que la hipótesis de los ductos sean el origen de la neogénesis de células beta en la vida postnatal (Inada, Nienaber et al. 2008; Xu, D'Hoker et al. 2008) mediante un estudio de trazado de linaje basado en el factor de transcripción Hnf1b que se expresa ya en el primordio pancreático embrionario y hasta la edad adulta en los ductos

Introducción: 2. Regulación de la masa celular beta

pancreáticos (Solar, Cardalda et al. 2009). Se marcaron genéticamente las células que expresan Hnf1b para comprobar si son células progenitoras a diferentes tiempos. Sus resultados muestran que durante el desarrollo embrionario antes del día E13,5 las células Hnf1b⁺ pueden dar lugar a todos los tipos celulares pancreáticos. Más adelante el epitelio ductal Hnf1b⁺ solamente puede diferenciarse a células ductales adultas o endocrinas pero no contribuye a formar el linaje acinar. Al final de la gestación, sin embargo, las células Hnf1b⁺ solo pueden dar lugar a células ductales y parecen haber perdido la capacidad de diferenciarse incluso en el caso de inducción de neogénesis con animales con ligadura del ducto pancreático. Por tanto, los autores concluyen que las células del compartimento ductal no constituyen las células progenitoras de células beta en la edad adulta.

Además de la controversia existente sobre la naturaleza de los precursores de las células endocrinas del páncreas, se desconoce cual es la importancia relativa de la neogénesis en los organismos adultos o, en otras palabras, si la formación de células beta a partir de precursores adultos es el mecanismo por el cual la masa beta se mantiene en la edad adulta. Así mismo, los datos actuales apuntan a que la regulación de la masa beta en el adulto puede realizarse por mecanismos distintos en roedores y humanos.

Un controvertido estudio del año 2004 negó la existencia de neogénesis significativa en el páncreas postnatal. En el estudio utilizaron el promotor de insulina para marcar genéticamente a las células y llevar a cabo el trazado de linaje celular (Dor, Brown et al. 2004). Los autores concluyeron que no había formación de nuevos islotes en los ratones después del nacimiento o de una pancreatectomía del 70%, sino que las nuevas células beta se formaban por replicación de las preexistentes, en claro desacuerdo con la hipótesis de las células progenitoras en el páncreas adulto .

En el 2008, Heimberg y colaboradores demostraron que el páncreas adulto sí contiene células progenitoras de los islotes (Xu, D'Hoker et al. 2008). En su estudio demostraban que después del daño inducido por la ligadura del ducto principal reaparecen células que expresan el gen Ngn3.

La reaparición de Ngn3 es clave ya que el factor de transcripción Neurogenina 3 (Ngn 3) actúa en la determinación pancreática definiendo el pool de precursores endocrinos en el endodermo embrionario (Apelqvist, Li et al. 1999). Estudios de trazado de linaje han demostrado que las células que expresan Ngn3 dan lugar exclusivamente a células endocrinas (Gu, Dubauskaite et al. 2002). En el páncreas adulto, Ngn3 ya no se expresa o lo hace a un nivel muy bajo. Sin embargo, se cree que la re-expresión de Ngn3 en células adultas puede ocurrir durante la regeneración.

Introducción: 2. Regulación de la masa celular beta

En ese mismo estudio se describió que esas células Ngn3^+ expresaban citoqueratinas y se localizaban cerca de los ductos pancreáticos. Además, estas células se consiguieron aislar del páncreas y se demostró su capacidad para diferenciarse a células insulares funcionales *in vitro*.

En un comentario acompañando el artículo anterior, Y. Dor y D. Melton resitúan el estudio de Heimberg y colaboradores en el contexto de lo que se sabe hasta el momento sobre la formación de nuevas células productoras de insulina (Dor and Melton 2008). De forma resumida, su interpretación es que durante el desarrollo embrionario del páncreas las nuevas células beta son generadas por una población transitoria de células que expresan el factor de transcripción neurogenina 3 (Ngn3). Sin embargo, en la vida post-natal los progenitores ngn3 positivos desaparecen y la expansión y mantenimiento del número de células beta dependen exclusivamente en la proliferación de células beta diferenciadas. Para los autores este es el modo “natural” por el cual las células beta se expanden en el adulto. Califican entonces de “importante excepción” el estudio del grupo de Heimberg. Admiten que en determinadas ocasiones un órgano puede activar células madre facultativas en respuesta a un determinado tipo de daño y subrayan las importantes implicaciones que conlleva el estudio. Queda de manifiesto que el páncreas adulto conserva el potencial necesario para reactivar el modo de formación embrionario de las células beta. Sin embargo, sería importante determinar cual de las dos fuentes tiene mayor capacidad de producción de nuevas células beta, la replicación de células pre-existentes o bien la diferenciación de estas células adultas que expresan Ngn3.

Por otra parte, quedan muchas incógnitas por resolver en cuanto a las células adultas Ngn3^+ . En primer lugar, sería de gran interés identificar cuales son las moléculas que inducen la expresión de ngn3 en la ligadura de ducto, así como en otros modelos. Por otra parte la biología de las células adultas Ngn3 sigue siendo desconocida, se desconoce si son capaces de migrar a los islotes o de proliferar. Y, quizás la más importante, es que no se sabe cual es la importancia terapéutica de estos descubrimientos. No se sabe si existen células Ngn3 en los pacientes con diabetes o si se encuentran en un número suficiente para tener un efecto fisiológico.

2.2 Replicación de las células beta

La tasa de replicación de las células beta adultas en rata es baja, pero es capaz de aumentar frente a incrementos de la demanda metabólica. Las células beta son capaces de proliferar frente a diversos estímulos como la glucosa, los factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), la hormona del crecimiento (GH), prolactina y lactógeno

Introducción: 2. Regulación de la masa celular beta

placentario, betacelulina (BTC) y péptido similar al glucagón (GLP-1) o sus análogos, entre muchos otros.

La glucosa es un importante regulador de la proliferación de las células beta. Swenne y colaboradores (Swenne 1982) fueron los primeros en demostrar que la glucosa adicionada a un cultivo de células beta fetales estimulaba la entrada en el ciclo celular de una parte de la población.

Los factores de crecimiento similares a la insulina IGF-1 e IGF-2 comparten receptores con la insulina aunque se unen a ellos con diferentes afinidades. Cuando los ligandos se unen a su receptor se inicia la cascada de señalización con la autofosforilación del receptor, lo que permite la unión de proteínas adaptadoras que a su vez serán fosforiladas en múltiples residuos tirosina. En estos residuos tirosina fosforilados se unen complejos de señalización, entre ellos los substratos del receptor de insulina o IRS. IRS-1 e IRS-2 están implicados en metabolismo de los carbohidratos y proliferación de las células beta respectivamente (White 2002). IGF-2 tiene un papel importante en el desarrollo embrionario, ya que se ha descrito que su expresión coincide con la gran oleada replicativa que se da lugar en ese período (Hill, Petrik et al. 1998). Cuando células de insulinoma de rata INS-1 se exponen a concentraciones elevadas de glucosa junto con IGF-1 (insulin growth factor 1) se detecta un aumento de la proliferación (Hügl, White et al. 1998).

HGF es un factor de crecimiento que se describió como asociado a la regeneración hepática. Se ha demostrado que tanto el HGF como su receptor (receptor tirosina quinasa codificado por c-met) se expresan en los islotes pancreáticos y que HGF actúa como un factor insulínico e mitogénico en células de islotes fetales o adultos (Otonkoski, Beattie et al. 1994; Otonkoski, Cirulli et al. 1996).

La GH, PRL y PL forman parte de la misma familia de hormonas y tienen un papel importante durante el embarazo, permitiendo el aumento de masa beta que tiene lugar durante el embarazo y la lactancia. Además hay estudios que demuestran la capacidad de GH de estimular la replicación de las células beta de islotes fetales, neonatales o de adulto (Sjöholm, Welsh et al. 1990; Billestrup and Nielsen 1991; Sjöholm and Hellerström 1991).

La betacelulina es un péptido anclado a la membrana plasmática de las células beta. Frente a determinados estímulos, la parte extracelular del péptido es cortada y es capaz de transactivar los receptores de EGF colindantes (siendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF) un factor de crecimiento de la misma familia). Se ha demostrado su efecto mitogénico en células de insulinoma de rata (Huotari, Palgi et al. 1998) .

El GLP-1 es un potente estimulador de la proliferación de las células beta y un análogo de GLP-1 es el objeto del presente estudio. Las acciones pro-mitogénicas del GLP-1 están detalladas en

el apartado 3.3.2.1 de esta introducción y el tema ha sido revisado en múltiples ocasiones (Perfetti and Hui 2004; Stoffers 2004; Baggio and Drucker 2006; Doyle and Egan 2007; Holst 2007) .

2.2.1 Ciclo celular de las células beta

La replicación de las células beta depende del estricto control de la entrada, progresión y salida del ciclo celular. Estos eventos se inician por la formación de los complejos ciclina (ciclina D) con quinasas dependientes de ciclinas (cdk4 o cdk6). Las ciclinas se sintetizan en respuesta al estímulo mitogénico mientras que las cdk's son constitutivas. En cada tejido se pueden activar diferentes ciclinas D, que conllevaran la formación de diferentes complejos ciclina D/ Cdk constituyendo el primer punto de control de entrada al ciclo. Para permitir la entrada en el ciclo celular el complejo Ciclina D/Cdk debe fosforilar para desactivarla la proteína del retinoblastoma (pRb). Esta fosforilación de Rb provoca la liberación de miembros de la familia E2F lo que induce irreversiblemente la progresión por el ciclo celular y la entrada en la fase G1. Desde 1996 se conoce que la ciclina D1 junto con la cdk4 tienen un papel crucial en la replicación de las células beta después de un estímulo mitogénico en modelos experimentales murinos (Dunlop, Muggli et al. 1996).

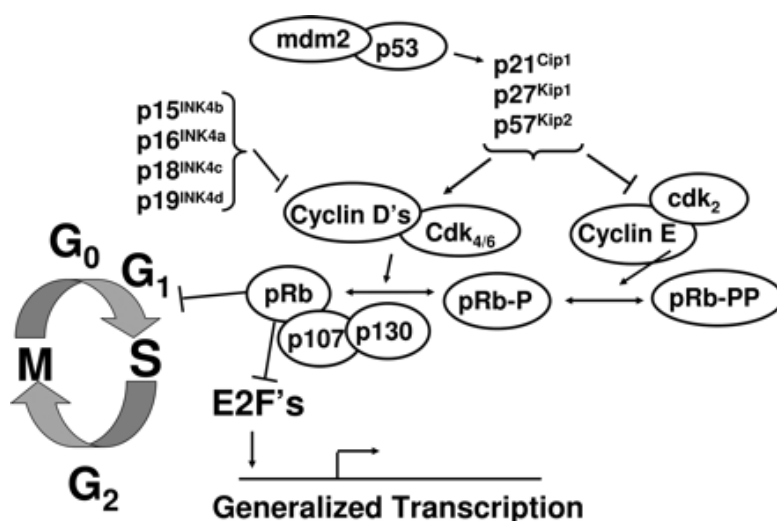


Figura 8: Vista esquemática de las proteínas que regulan el ciclo de las células beta. Adaptado de (Cozar-Castellano, Fiaschi-Taesch et al. 2006).

Junto con estas proteínas también se han descrito una serie de proteínas inhibitoras, que bloquean la fosforilación de pRb e inhiben la proliferación. La familia de las INK 4 son capaces de

Introducción: 2. Regulación de la masa celular beta

inhibir específicamente los complejos Ciclina D/Cdk4 y la familia CIP/KIP tiene capacidad inhibidora de CDKs más amplia.

2.2.2 Eventos intracelulares que promueven replicación

La estimulación de la replicación de células INS con IGF-1 y glucosa (ver 3.2) se correlaciona con el aumento de la fosforilación del sustrato del receptor de insulina 2 (irs-2) lo que conlleva a la activación de la quinasa 3' fosfatidilinositol (PI3K) (Hügl, White et al. 1998).

La señalización por la vía de la PI3K es importante en varias funciones celulares como pueden ser crecimiento, proliferación, supervivencia y gran parte de estas son mediadas por la familia de proteínas serina/threonina quinasas Akt /PKB. Estudios en los que se sobreexpresó la proteína Akt confirmaron que Akt promueve el crecimiento de las células beta (Bernal-Mizrachi, Wen et al. 2001; Tuttle, Gill et al. 2001).

2.2.3 Principales factores que modifican la expresión de ciclinas

La expresión de las ciclinas D puede ser regulado por hormonas o por factores de crecimiento. Se ha demostrado que la hormona del crecimiento y la prolactina, que señalizan a través de la vía JAK2/STAT5 inducen la expresión de ciclina D2 (Friedrichsen, Galsgaard et al. 2001) mientras que las incretinas GLP-1 y GIP inducen la expresión de ciclina D1 (Friedrichsen, Neubauer et al. 2006).

La exposición de corta duración y a dosis fisiológicas a glucosa tiene un papel estimulador del crecimiento de las células beta pancreáticas en los modelos con roedores mientras que exposiciones a la glucosa de forma prolongada o a concentraciones elevadas tienen efectos deletéreos en la función de las células beta. La ciclina D2 podría tener un papel en la replicación inducida por glucosa como lo sugiere un estudio en el que se describe un aumento de la expresión y de la localización nuclear de la ciclina D2 en respuesta a una infusión de glucosa al 50% durante 4 días (Alonso, Yokoe et al. 2007). Sin embargo Jetton y colaboradores (Jetton, Everill et al. 2008) no encontraron diferencias en expresión, determinada por inmunohistoquímica, de ciclina D2 en los islotes de rata infundidas con glucosa al 20% durante cuatro días respecto a los islotes control. El papel de la ciclina D2 en la proliferación inducida por glucosa queda por clarificar.

2.3 Cambios en el tamaño de las células beta

La regulación de la masa beta por cambios en el tamaño de las células es un mecanismo aceptado, pero aún no se han descrito los mecanismos que lo permiten. Parece ser que un aumento en la demanda metabólica podría causar un aumento del tamaño de las células, que junto con el aumento de replicación producirían un aumento de masa beta para suplir la demanda.

El embarazo es una situación fisiológica de regulación de la masa beta en la que se han descrito cambios en el tamaño de las células beta .

Durante el embarazo los islotes de la madre se adaptan a los nuevos requerimientos metabólicos aumentando la replicación y el tamaño de las células beta por acción del lactógeno placentario (Parsons, Brelje et al. 1992; Parsons, Bartke et al. 1995). El aumento de masa beta se compensa en los días después del parto, durante los cuales el aumento de apoptosis de las células beta permite restablecer la masa beta normal (Scaglia, Smith et al. 1995).

Los mecanismos de aumento de tamaño podrían ser mediados por la proteína Akt (también llamada PKB), habiéndose descrito que la sobreexpresión de una Akt constitutivamente activa en ratones promueve un aumento del tamaño de las células beta (Bernal-Mizrachi, Wen et al. 2001; Tuttle, Gill et al. 2001). Más recientemente se ha sugerido que Akt induce hipertrofia de las células beta por activación e inactivación de las quinasas Serina/Threonina mTOR (del inglés, *mammalian target of rapamycin*) y GSK-3 respectivamente (Dickson and Rhodes 2004).

2.4 Muerte de las células beta

El aumento en la masa de células beta producido por replicación o neogénesis puede ser contrareestado por la disminución del número de células mediante la muerte celular por apoptosis o necrosis.

Se han descrito dos mecanismos diferenciados de muerte celular, uno de ellos es programado y conlleva gasto de energía, denominado apoptosis y otro pasivo, llamado necrosis. Estos dos tipos de muerte celular pueden darse lugar a la vez en un mismo tejido y dependen básicamente de la duración o intensidad del estímulo.

Introducción: 2. Regulación de la masa celular beta

2.4.1 Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada permite moldear el tejido pancreático durante el desarrollo embrionario y la vida adulta del individuo. La muerte por apoptosis es un proceso rápido, controlado genéticamente, que utiliza energía ya que requiere síntesis proteica. Comporta la síntesis *de novo* de diferentes proteínas y una regulación del proceso muy precisa y por lo tanto, requiere un gran consumo de ATP. Afecta a la célula de forma individual y también se suele denominar “suicidio celular”.

En una primera fase se produce la condensación y fragmentación del DNA, que se acumula en la periferia del núcleo lo que reduce su tamaño. Esta fragmentación del DNA es el parámetro que detecta el ensayo por la técnica del TUNEL utilizado de forma muy habitual para cuantificar la apoptosis. También se produce una reducción del volumen total de la célula y la compactación de los orgánulos citoplasmáticos. Sin embargo, las mitocondrias mantienen su estructura. En la segunda fase del proceso se produce un “recogimiento” de la membrana sin rotura y la formación de los cuerpos apoptóticos, constituidos por fragmentos celulares envueltos por membrana. Estos cuerpos apoptóticos serán fagocitados por las células colindantes o macrófagos evitando que se produzca respuesta inflamatoria. En la tercera fase los cuerpos apoptóticos no fagocitados degeneran en un proceso parecido al de necrosis que se denomina necrosis secundaria.

Una gran variedad de factores pueden activar el proceso de apoptosis como por ejemplo diferentes productos químicos (radicales libres de oxígeno, fármacos), daños físicos en la célula (rayos X, choque térmico), el ataque de otras células (células T), citoquinas (TNF- α) la pérdida de factores tróficos (hormonas, IL-2, IL-3) o del contacto con la matriz extracelular (el proceso se conoce como muerte celular por anoikis).

2.4.2 Necrosis

La necrosis se produce como resultado de un daño severo y brusco que puede afectar a todo un conjunto de células o a una zona de tejido. La necrosis es un proceso accidental, que provoca la destrucción no controlada de la célula. Se caracteriza por cambios morfológicos en la célula que hacen que ésta no pueda mantener la homeóstasis. El primer cambio morfológico que se produce es que se hinchan las mitocondrias y se forman depósitos de lipoproteínas en la matriz mitocondrial; después hay una alteración de la membrana celular que pierde su capacidad reguladora de la presión osmótica, con la ruptura de los balances de sodio, calcio y agua. Como consecuencia de estas

Introducción: 2. Regulación de la masa celular beta

alteraciones la célula se hincha y se produce el choque osmótico. Finalmente los lisosomas y el retículo endoplásmico también se hinchan y explotan, liberando enzimas digestivos que inducen la destrucción autocatalítica de la célula. La rotura de la membrana provoca que se libere el contenido intracelular y la inflamación del tejido.

Los factores que pueden provocar necrosis son hipoxia grave, isquemia, factores que dañan la membrana celular como toxinas, un trauma sobre el tejido, tóxicos químicos, especies reactivas de oxígeno o inhibidores de bombas de iones.

3. Masa beta y diabetes

3.1 Diabetes

El control óptimo de los niveles de glucosa sanguínea depende de pequeños cambios en la producción y secreción de insulina por parte de las células beta y de su capacidad de aumentar la secreción después de las comidas. Es de gran importancia que la masa celular beta esté finamente regulada para adaptarse a las necesidades del organismo. La destrucción de las células beta o el “fallo” en adaptar la masa beta a cambios en las necesidades, como por ejemplo cambios en el peso corporal, el embarazo o reducción en la sensibilidad a la insulina de los tejidos periféricos puede provocar la aparición de concentraciones elevadas de glucosa en sangre de manera crónica o diabetes.

Un aspecto central del desarrollo de la diabetes tanto de tipo 1 como de tipo 2 es una reducción en el número de células productoras de insulina.

3.1.1 Patogénesis

Según datos de la organización mundial de la salud del 2009 aproximadamente 220 millones de personas de todo el mundo tienen diabetes y se predice que el número de muertes por diabetes (1.1 millones de personas en 2005) alcanzará más del doble el año 2030. El 90% de los enfermos presentan diabetes de tipo 2. ([WHO Fact Sheet N° 312, Noviembre 2009](#)).

La diabetes mellitus es una enfermedad heterogénea que se caracteriza principalmente por la presencia de hiperglucemia. Existe una disminución de la secreción de insulina y/o una resistencia a su acción que resultan en el aumento de los niveles de glucosa en sangre y en perturbaciones en el metabolismo de lípidos y proteínas. A largo plazo, la diabetes puede causar complicaciones microangiopáticas oculares, renales o del sistema nervioso y complicaciones macrovasculares entre las que encontraremos enfermedades coronarias y vasculopatía en las extremidades inferiores. La presencia de diabetes aumenta entre dos y cuatro veces el riesgo de muerte cardiovascular.

La diabetes mellitus se subdivide en dos tipos principales. La diabetes de tipo 1 es causada por destrucción autoinmune de las células beta del páncreas, suele aparecer en adolescentes y niños y representa aproximadamente un 10% de los pacientes diabéticos. La deficiencia casi total de insulina endógena es la causa por la que estos pacientes requieren la administración de insulina exógena para sobrevivir. La diabetes de tipo 2 está causada por una resistencia a la insulina junto con una inadecuada secreción de esta hormona y una función y masa deficientes, suele presentarse en

pacientes adultos y engloba al 90% de los sujetos diabéticos. Para regular los niveles de glucosa, los pacientes con diabetes de tipo 2 siguen un tratamiento con medidas dietéticas y ejercicio, asociadas en general a fármacos hipoglucemiantes orales. Un número significativo de pacientes con diabetes tipo 2 requieren la administración de insulina exógena de forma puntual o crónica.

3.1.1.1 Diabetes Tipo 1

La diabetes de tipo I es una enfermedad crónica habitualmente precedida por un conjunto de síntomas tempranos en los que se pueden detectar autoanticuerpos contra antígenos del islote. La enfermedad se desarrolla en varias fases que van desde la susceptibilidad genética hasta la destrucción casi completa de la masa beta y la diabetes clínica (Gianani and Eisenbarth 2005):

1) **Susceptibilidad genética.** Una persona tiene un 2% de probabilidades de desarrollar una diabetes tipo 1 si su madre también es diabética, un 8% si su padre lo es y la probabilidad sube al 30% si ambos lo son (www.diabetes.co.uk). Uno de los aspectos que queda por esclarecer en la patogenia de la diabetes de tipo 1 es determinar de forma clara cual es la causa o factor desencadenante de la reacción autoinmunitaria. Se sabe que es una enfermedad con factores de predisposición y se han identificado factores genéticos que causan propensión a la enfermedad. Los genes que codifican moléculas de HLA de clase 2, CTLA4 e insulina han sido asociados con susceptibilidad a diabetes (Onengut-Gumuscu and Concannon 2005).

2) **Inicio de la autoinmunidad.** Muchas veces estímulos ambientales pueden causar predisposición como virus y toxinas (Devendra, Liu et al. 2004; Todd 2010). En la mayoría de los casos en los que un enterovirus está implicado la enfermedad aparece al activarse la autoinmunidad en individuos susceptibles.

3) **Activación de la autoinmunidad.** Aparecen autoanticuerpos contra insulina, GAD-65 o IA-2.

4) **Pérdida progresiva de la secreción de insulina.** Los sujetos empiezan a presentar una caída o incluso pérdida de la primera fase de secreción de insulina que se corresponde con una pérdida de la masa beta estimada del 40-50%. La pérdida de la secreción es gradual, en acuerdo con la hipótesis de que la destrucción de las células beta es un fenómeno crónico.

5) **Diabetes Clínica.** La diabetes clínica se produce cuando aproximadamente el 80-90% de la masa beta ha sido destruida. Los anticuerpos contra antígenos del islote siguen siendo detectables algún tiempo después del establecimiento de la enfermedad pero acaban desapareciendo en el 50% de los pacientes con varios años de enfermedad.

Introducción: 3. Masa celular beta y Diabetes

6) **Dependencia a la insulina con pérdida casi total de las células beta insulares.** La pérdida gradual de células beta se monitoriza gracias a los niveles de C-péptido secretados.

3.1.1.2 Diabetes Tipo 2

La diabetes de tipo 2 se caracteriza por un defecto en la secreción de insulina, masa beta insuficiente y resistencia periférica a la insulina. La obesidad es el principal factor de riesgo para la aparición de resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.

En el desarrollo de la diabetes de tipo 2 participa una reducción de la masa de células beta que no permite hacer frente al aumento en la demanda metabólica generada por la resistencia a la insulina (Prentki and Nolan 2006). Esta reducción en la masa beta se ha demostrado en los modelos de diabetes de tipo 2 y más recientemente se ha confirmado de forma clara en humanos (Butler, Janson et al. 2003; Rahier, Guiot et al. 2008).

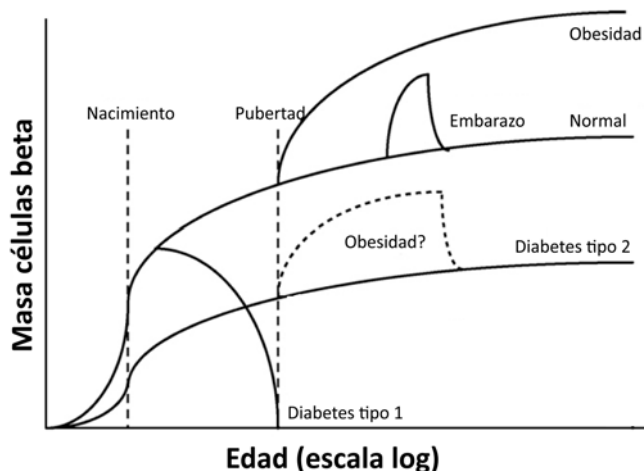


Figura 10: Cambios en la masa de células beta a lo largo de la vida. La masa de células beta varía según las condiciones fisiológicas o patológicas. Esta se incrementa en situaciones en las que hay una demanda incrementada de insulina, por ejemplo en el período neonatal, en la obesidad o durante el embarazo. La destrucción de las células beta por autoinmunidad durante la infancia conduce a la diabetes de tipo 1. La diabetes de tipo 2 se asocia con una falta de aumento de la masa beta que se podría relacionar con afectaciones en el desarrollo embrionario del páncreas endocrino en combinación con obesidad postnatal y con la pérdida de células beta debida a gluco-lipotoxicidad. *Esquema adaptado de (Lee and Nielsen 2009)*

3.2 Terapias para la diabetes

El tratamiento de la diabetes tipo 1 consiste actualmente en administrar a los pacientes inyecciones de insulina exógena. Sin embargo, este tratamiento tiene importantes limitaciones, la

principal de las cuales es la incapacidad para mantener un control glucémico normal, lo que puede dar lugar a la aparición de las complicaciones crónicas de la enfermedad.

Las terapias en desarrollo para el tratamiento de la diabetes se centran en restablecer la masa beta de los sujetos diabéticos para así evitar las complicaciones clínicas que pueden derivarse de un control glucémico deficiente. Las dos formas por las que se podría conseguir el restablecimiento de la masa beta de un paciente diabético son por regeneración de la propia masa beta del paciente o bien por reposición de la masa celular beta gracias a una fuente externa de células productoras de insulina.

3.2.1 Regeneración de la masa beta existente

La regeneración de la masa celular beta se basa en dos mecanismos principales. El primero es la proliferación de las células beta restantes y el segundo la generación de nuevas células beta a partir de precursores pancreáticos.

La regeneración de la masa beta en modelos experimentales de daño pancreático como la pancreatectomía subtotal ha sido ampliamente estudiada desde hace muchos años. A pesar de que sigue existiendo una cierta controversia sobre cual es el tipo celular progenitor adulto y sobre la importancia de los mecanismos de neogénesis en el adulto la regeneración pancreática en el humano adulto sigue siendo un esperanzador campo de estudio para la curación de la diabetes (Butler, Galasso et al. 2010; Halban, German et al. 2010; Jun 2010).

3.2.1.1 Pancreatectomía

La pancreatectomía parcial es un modelo experimental de diabetes, donde la reducción de la masa beta provoca una alteración del metabolismo de la glucosa más o menos grave en función de la extensión de la pancreatectomía. Además, la pancreatectomía parcial es un modelo muy bien establecido de regeneración de los islotes pancreáticos en el que se ha propuesto que tanto la replicación como la neogénesis contribuyen a regenerar la masa de células beta (Bonner-Weir and Sharma 2002), así como de regeneración del páncreas exocrino.

A diferencia de la robusta regeneración hepática, la eliminación quirúrgica de una parte del páncreas provoca un crecimiento regenerativo limitado y nunca se consigue restaurar el volumen pancreático original. La respuesta regenerativa es proporcional a la parte del páncreas que se ha eliminado. Si se elimina la mitad del volumen pancreático el páncreas residual crecerá solamente un 20%. En el caso de un remanente de un tercio del páncreas –después de una pancreatectomía del 60%- se consigue que el páncreas crezca aproximadamente un 30%. En el caso de dejar una porción

Introducción: 3. Masa celular beta y Diabetes

pancreática del 10% del remanente pancreático crecerá aproximadamente un 80% (Pearson, Scott et al. 1977). La parte endocrina del páncreas se expande también de forma limitada ya que después de una pancreatectomía de dos terceras partes se observa un crecimiento de la masa beta residual del 30% (De León, Deng et al. 2003).

Dor et al (Dor, Brown et al. 2004) utilizaron una aproximación por trazado de linaje celular para mostrar que después de una pancreatectomía del 70% no hay evidencias de nueva formación de células beta a partir de progenitores adultos (ver apartado 2.2 de la introducción). Este estudio parecía en contradicción con aquellos estudios en los que se observaba neogénesis de células beta a partir de células ductales en proliferación después de una pancreatectomía subtotal (Bonner-Weir, Baxter et al. 1993). Esta aparente discrepancia se podría explicar por diferencias en la extensión del daño y la capacidad estimuladora de crecimiento entre los dos modelos, pancreatectomía del 70 o del 90%. Otra diferencia clave es que la pancreatectomía del 90% induce intolerancia a la glucosa mientras que la del 70% no. Sería posible entonces que en la pancreatectomía del 70% solo se activase la replicación de la células beta mientras que en la del 90% se obtenga una respuesta regenerativa mayor por neogénesis junto con replicación de las células beta. Además el estudio de Bonner-Weir se llevó a cabo en ratas mientras que el de Dor en ratones.

En otros estudios con pancreatectomía del 90% la masa de células beta era capaz de duplicarse en una semana (Plachot, Movassat et al. 2001) mientras que solo se inducía un aumento del 30-40% 4 semanas después de una pancreatectomía del 60% (Leahy, Bonner-Weir et al. 1988). Estos datos confirman que la extensión de la pancreatectomía condiciona la respuesta regenerativa en el remanente pancreático.

En ratas pancreatectomizadas al 90%, la destrucción de las células beta por tratamiento con estreptozotocina antes de la cirugía no afectaba a la capacidad regenerativa del páncreas sugiriendo que es posible obtener una regeneración parcial solamente a partir de neogénesis de células beta (Finegood, Weir et al. 1999).

La pancreatectomía desencadena un proceso regenerativo que permite la formación de nuevos lóbulos pancreáticos de los preexistentes. Este proceso implica formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) para vascularizar el tejido recién formado. Se sabe que después de una pancreatectomía se induce la expresión de una gran cantidad de factores de crecimiento entre los que podemos encontrar VEGF (Oberberg-Welsh, Sandler et al. 1997) y c-myc (Laybutt, Glandt et al. 2003) que se ha demostrado que son necesarios para el proceso de angiogénesis en otros tejidos (Dvorak, Brown et al. 1995; Baudino, McKay et al. 2002). Tras una pancreatectomía del 60% el flujo sanguíneo de los islotes se encuentra aumentado respecto a los animales control con operación

simulada (Sham) a pesar de una reducción en la masa pancreática total (Jansson and Sandler 1989). El estudio concluía que la pancreatectomía parcial induce un aumento transitorio en el flujo sanguíneo pancreático y uno más duradero en el flujo por islote. Estas observaciones reflejan probablemente la distinta regeneración de las células endocrinas y exocrinas además de la aumentada carga funcional del órgano (Jansson and Sandler 1989).

En el 2007 se publicó un estudio que refuerza la idea de que la pancreatectomía resulta en la síntesis de factores pro-angiogénicos. Se demostraba que los islotes transplantados a un animal que ha sido previamente pancreatectomizado presentan mayor aporte sanguíneo, tensión de oxígeno y densidad de vasos sanguíneos y masa endocrina un mes después del trasplante en comparación con los transplantados a animales control. Sugiriendo que los factores sintetizados después de la pancreatectomía no solamente pueden actuar sobre el páncreas endógeno sino que también favorecen la vascularización de los islotes transplantados (Johansson, Jansson et al. 2007).

3.2.2 Reposición de la masa beta

La otra estrategia para restablecer la masa beta perdida en situación de diabetes es la de reponer las células productoras de insulina necesarias para restablecer la normoglucemia del sujeto.

Una de las opciones es la del trasplante de islotes, que consiste en aislar los islotes de un páncreas de un donante cadáver para luego infundirlos en un paciente con T1DM a través de la vena porta del receptor. Los islotes impactan entonces en los sinusoides hepáticos donde quedan situados. Desde ahí los islotes funcionan con normalidad y secretan insulina en función de los niveles de glucosa sanguínea (Figura 11). Las células beta del injerto van a proseguir con su función secretora de insulina lo que implicará un restablecimiento de la glicemia del receptor del trasplante.

A parte del trasplante de islotes se pueden considerar otros tipos de terapias celulares que consisten en transplantar células productoras de insulina derivadas de otros tipos celulares. Estas células podrían derivar de células madre embrionarias o de células pluripotenciales adultas de órganos como la médula ósea, el hígado, el intestino o el propio páncreas (Serup, Madsen et al. 2001; Montanya 2004; Sutherland, Gruessner et al. 2004; Gangaram-Panday, Faas et al. 2007).

Introducción: 3. Masa celular beta y Diabetes

3.2.2.1. Transplante de islotes

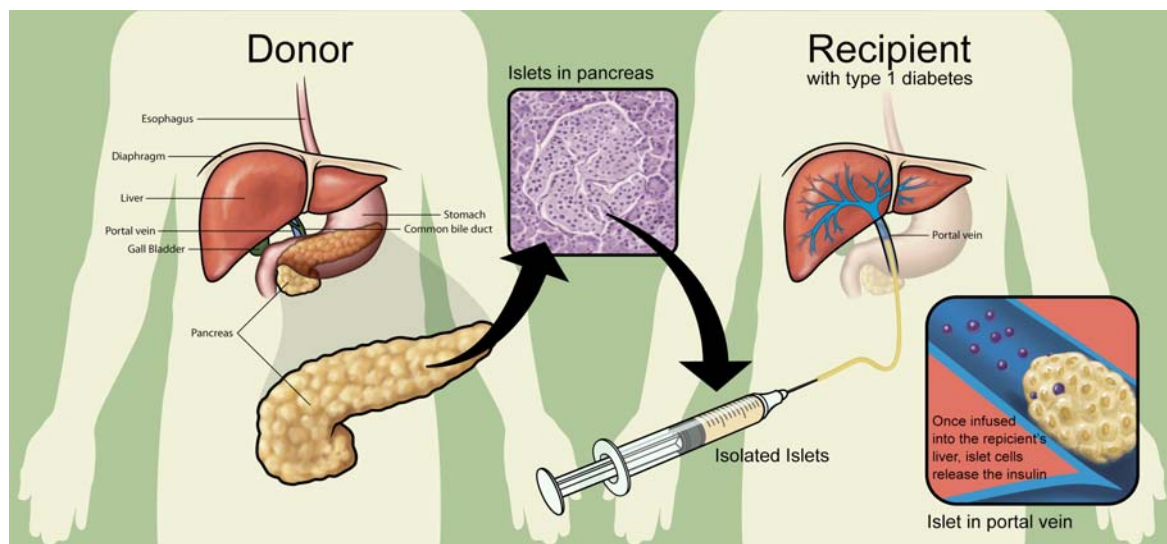


Figura 11: Transplante de islotes. De (Naftanel and Harlan 2004)

a) Breve historia del transplante de islotes

El transplante de islotes se empezó a conocer a principios de los años 70 cuando Lacy y colaboradores demostraron que ratones diabéticos normalizaban su glucemia después del transplante de islotes (Ballinger and Lacy 1972). A lo largo de los años 70 y 80 hubo varios intentos de transplante en humanos pero que resultaron sin éxito. Más adelante, durante los años 90 se consiguieron algunos resultados positivos, logrando que algunos pacientes presentasen niveles normales de glucosa en sangre, sin tratamiento con insulina, más de un año después de la intervención (Warnock, Kneteman et al. 1992). Sin embargo, el registro de Transplante de islotes informaba el año 2000 que solamente el 12% de los transplantes conseguían la insulino-independencia y que solo el 8% de los pacientes transplantados entre los años 1990-1999 se mantuvieron normoglucémicos durante más de un año (White, Nicholson et al. 2000). En el año 2000 Shapiro y sus colaboradores de Edmonton publicaron que el 100% de siete pacientes consecutivos con DM-1 que habían recibido un transplante se habían mantenido normoglucémicos durante más de un año (Shapiro, Lakey et al. 2000; Ryan, Lakey et al. 2002). En el 2002 (Ryan et al. 2002) de los 17 pacientes transplantados 15 de ellos llevaban transplantados más de un año y 12 de estos seguían siendo insulino-independientes. De los 6 pacientes que llevaban más de dos años transplantados 4 seguían siendo insulino-independientes. La clave de este éxito fue el transplante de un gran número de islotes y un cambio en la pauta inmunosupresora. El número de islotes que recibía cada paciente

era de aproximadamente unos 800.000 islotes, una cantidad superior a la requerida para el mantenimiento de la normoglucemia ya que el autotransplante de 300.000 islotes se relaciona con un 75% de insulino-independencia (Teuscher, Kendall et al. 1998). El cambio en la pauta inmunosupresora fue también determinante para el éxito del grupo de Edmonton ya que se eliminaron los fármacos que contenían glucocorticoides que podían afectar a la función y supervivencia de la células beta ya que se acumulan en el hígado, lugar donde se encuentran los islotes transplantados por embolización portal subcutánea.

Sin embargo, las expectativas generadas por este éxito disminuyeron con la publicación de los resultados a 5 años, que mostraban el mantenimiento de la insulino-independencia en el 10 % de los pacientes transplantados. Sin embargo, alrededor del 80% de los pacientes con función inicial del injerto la mantenían a los 5 años del transplante, lo que les permitía disfrutar de un excelente control metabólico con unas dosis reducidas de insulina (Ryan, Paty et al. 2005). El estudio multicéntrico internacional ITN confirmó la obtención de estos resultados (Shapiro, Ricordi et al. 2006). En este estudio multicéntrico se monitorizaron 36 paciente transplantados. Un año después del transplante el 44% de ellos eran independientes de la insulina y presentaban un adecuado control glucémico mientras que el 28% de los transplantados presentaban función parcial del injerto y el 28% restante habían perdido totalmente el injerto. Solamente el 31% de los pacientes que eran insulino-dependientes al año de ser transplantados lo seguían siendo después de dos años.

Estudios más recientes han presentado una mejora en los resultados a largo plazo. En el 2009 se publicaron los resultados de un ensayo clínico de fase dos en el que se habían transplantado islotes a catorce pacientes consecutivos (Vantyghem, Kerr-Conte et al. 2009). Justo después del transplante todos los pacientes eran insulino-independientes y el 64% de ellos presentaban un control glucémico óptimo. A los tres años el 57% de los transplantados seguían siendo independientes de la insulina y el 50% mantenían un control óptimo de la glucosa sanguínea.

El registro colaborativo de trasplantes de islotes (CITR) recoge la información de estudios de transplante de islotes en humanos desde el año 1999. En el año 2009 se publicó el informe que recopila 285 trasplantes de islotes llevados a cabo entre los años 1999 y 2006 en 25 centros americanos y uno europeo. Los factores que sobresalen como determinantes para el éxito del injerto son, el tamaño de los islotes transplantados (ser mayor a 1 IEQ), el hecho de haber recibido más de una infusión de islotes, presentar niveles pre-transplante bajos de hemoglobina glicada (HbA1c), y un tiempo corto de isquemia fría (CITR 2009).

El transplante de islotes permite en definitiva, alcanzar la insulino independencia a corto-

Introducción: 3. Masa celular beta y Diabetes

medio plazo y al mantener la producción de insulina por el injerto evita las hipoglucemias y mejora la estabilidad de la glucemia (normalización del HbA1c) con lo que consigue mejorar el estado metabólico de los pacientes transplantados, incluso en aquellos en los que se precisa la co-administración de insulina exógena.

b) Limitaciones del trasplante

El escaso número de órganos disponibles para el proceso de aislamiento y posterior trasplante de islotes, junto con la necesidad de tratamiento inmunosupresor, es la principal limitación para el trasplante de islotes. España es el país con más donaciones de órganos desde hace 18 años, 1606 durante el año 2009 según la Organización Nacional de Trasplantes. A pesar de ello son claramente insuficientes para tratar a los 100.000 diabéticos de tipo I del territorio (Montanya 2001). Además, la necesidad de utilizar dos o tres páncreas para cada paciente, dada la baja eficiencia del proceso de aislamiento es un factor agravante del problema. Esta baja eficiencia es debida entre otros factores al componente artesanal que aún tiene el aislamiento de islotes, a los enzimas utilizados durante la digestión del páncreas -que contienen una cierta actividad endotoxina- y a la cierta toxicidad de los gradientes ficoll que se utilizan para hacer la purificación de los islotes. Estos tres factores son los principales causantes de la gran variabilidad existente entre diferentes aislamientos en cuanto a calidad, número y pureza de los islotes obtenidos. Estudios realizados por diferentes grupos demuestran que la actividad endotoxina presente en algunos reactivos utilizados en el proceso del aislamiento puede estimular la expresión de citocinas pro-inflamatorias (Jahr, Hering et al. 1995; Vargas, Vives-Pi et al. 1998; Jahr, Pfeiffer et al. 1999) por parte de los macrófagos residentes en los islotes. Estas activarían las células endoteliales lo que favorecería la migración de los monocitos y polimorfonucleares que expandirían la respuesta inflamatoria local que a su vez podría verse reforzada por la producción de óxido nítrico o NO por parte de los macrófagos u otros tipos celulares (Montolio, Biarnes et al. 2007). Además, este NO podría estar induciendo pérdida de función en las células beta (Stevens, Ansit et al. 1996; Vargas, Vives-Pi et al. 1998).

Aunque la obtención de los islotes es un proceso limitante para el trasplante, no es el único responsable de la necesidad de utilizar más de un páncreas para transplantar a un paciente, ya que después del trasplante hay una gran pérdida de masa celular beta debida a dos fenómenos.

- Rechazo agudo del injerto alogénico. La pérdida del injerto de islotes es debida a un ataque inmunológico en el que intervienen las APCs y los linfocitos T CD4+, conjuntamente con una mezcla de citoquinas pro-inflamatorias, IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-10 (Scharp, Lacy et al. 1991; Ricordi, Tzakis et al. 1992) e INF- γ (Diamond and Gill 2000).

- Pérdida de función primaria (primary nonfunction, PNF). La pérdida de función primaria se define como la pérdida de función de los islotes transplantados debido a causas diferentes al rechazo inmunogénico. Se ha descrito que en los primeros días después del trasplante los islotes no son del todo funcionales y este hecho se ha asociado a una inflamación no-específica que se produce en el sitio de implantación y a una falta de vascularización de los islotes en estos primeros días. Cuando los islotes se encuentran en el páncreas están muy vascularizados (reciben un 10% del flujo sanguíneo del páncreas (Lifson, Kramlinger et al. 1980)). Sin embargo, en el proceso de aislamiento de islotes estos pierden todas sus conexiones vasculares y nerviosas. Una vez transplantados los islotes deben ser revascularizados por los tejidos circundantes para alcanzar plenamente su función. No será hasta el día 10 después del trasplante aproximadamente que los islotes vuelven a estar vascularizados (Menger, Yamauchi et al. 2001). Por lo tanto, durante los primeros días después del trasplante los islotes carecen de la vascularización necesaria y están sometidos a hipoxia que no solo afecta al metabolismo celular sino también a su viabilidad (Davalli, Scaglia et al. 1996).

c) Perspectivas y trasplante de islotes experimental

Así pues, el trasplante de islotes es una terapia muy esperanzadora pero con significativas limitaciones que deben ser solventadas como la obtención de islotes de buena calidad, evitar la pérdida de masa celular beta después del trasplante y mejorar la pauta inmunosupresora.

En paralelo a los avances conseguidos en el trasplante clínico de islotes, el trasplante de islotes a roedores es un modelo experimental muy utilizado. El trasplante de islotes a roedores permite, por una parte, comprender como evoluciona la masa beta transplantada, por otra probar nuevas estrategias que permitan mantener la masa beta transplantada y finalmente y de forma más general estudiar a las células beta en un entorno *in vivo* pero a la vez aislado del resto de tipos celulares pancreáticos.

Nuestro grupo ha observado que la pérdida de función primaria del injerto está relacionada con la muerte de más del 60% de la masa celular beta transplantada en los primeros días después del trasplante. Esta muerte inicial es debida tanto a procesos de apoptosis como de necrosis que no pueden ser contrarrestados por la replicación que encontramos en las células beta transplantadas (Biarnes, Montolio et al. 2002). De hecho, nuestro grupo ha descrito la inflamación no específica que aparece en los primeros días después del trasplante en la que se induce la expresión de varias citoquinas pro-inflamatorias, y entre ellas IL-1 β y TNF- α que son bien conocidas por sus efectos

Introducción: 3. Masa celular beta y Diabetes

deletéreos sobre las células beta (Montolio, Téllez et al. 2007). También hemos demostrado que en los primeros días después del trasplante se induce una situación de estrés en la que se expresan una serie de genes tanto pro como anti-apoptóticos (Rodríguez-Mulero and Montanya 2008).

Nuestro grupo estudia diferentes estrategias que puedan contrarrestar esta muerte inicial.

La pérdida en los días iniciales de masa beta transplantada podría verse compensada por influencia de alguno de estos tres mecanismos:

- inhibición de la apoptosis
- aumento de la replicación
- aumento de neogénesis/ regeneración

Hemos estudiado la inhibición de la apoptosis y aumento de la replicación en los injertos a través de estudios sobre el trasplante de islotes pre-incubados con inhibidores de caspasas (Montolio, Tellez et al. 2005), islotes que sobreexpresan factores inhibidores de la acción de determinadas citoquinas (Tellez, Montolio et al. 2007) o islotes que sobreexpresan factores de crecimiento (Estil les, Téllez et al. 2009).

4. Péptido similar al glucagón 1 (GLP-1)

El péptido similar al glucagón-1 (GLP-1, del inglés Glucagon-Like-Peptide 1) es una hormona incretina secretada por las células L del intestino que promueve la biosíntesis y secreción de insulina. Sus efectos sobre la secreción de insulina así como unas más recientemente descritas acciones sobre la masa beta le han conferido un más que notable interés en el contexto de la diabetes.

Una de las acciones más relevantes del GLP-1 es la de actuar como hormona incretínica (Kreymann, Williams et al. 1987). El efecto incretina consiste en la amplificación de la secreción de insulina por la acción de hormonas secretadas en el tracto gastrointestinal. En el sentido estricto, el efecto incretina se cuantifica comparando, para una misma concentración plasmática de glucosa, la secreción de insulina en respuesta a la administración oral de glucosa con la respuesta a la administración intravenosa. En sujetos sanos la administración oral de glucosa ocasiona una secreción de insulina de 2 a 3 veces mayor que la administración por ruta intravenosa a igualdad de glucemia alcanzada. Las dos hormonas incretínicas más importantes son GIP (Glucose-dependent Insulinotropic Peptide) y GLP-1. Ha habido un cierto desacuerdo acerca de los papeles relativos de las dos hormonas incretínicas. GIP circula a una concentración unas diez veces mayor a la de GLP-1, pero la acción del GLP-1 es más potente. Las dos hormonas aumentan activamente la secreción de insulina desde el principio de la ingesta aunque el efecto del GLP-1 es el que predomina a altas concentraciones de glucosa. Además, solamente el GLP-1, y no el GIP inhibe la secreción de glucagón (Holst 2007).

El efecto incretina tiene un papel fundamental en la secreción de insulina postprandrial y por extensión en la tolerancia a la glucosa de humanos y animales.

4.1. El péptido GLP-1

El GLP-1 es sintetizado en el intestino por modificación post-traduccional del proglucagón, producto del gen del glucagón. El factor de transcripción pax6 se expresa en las células L intestinales y activa la transcripción del proglucagón. También ha sido demostrado que la β catenina, el efector principal de la vía de señalización de Wnt es capaz de activar la expresión de proglucagón en las células intestinales, pero no en los islotes pancreáticos. Este efecto está mediado por el factor de transcripción TCF7L2 (antiguamente llamado TCF-4), altamente expresado en las células endocrinas del intestino (Holst 2007). La regulación por TCF7L2 de la expresión de GLP-1 en el intestino tiene un notable interés ya que se ha detectado una asociación genética de un polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en varias poblaciones, el microsatélite DG10478 en el intrón 3 del gen TCF7L2 con el desarrollo de diabetes de tipo 2. Este descubrimiento podría sugerir que el SNP influye en la

Introducción 4 .GLP-1

susceptibilidad a la enfermedad al modular la expresión intestinal del gen del proglucagón y posiblemente los niveles de GLP-1 circulantes (Grant, Thorleifsson et al. 2006).

En el páncreas el procesamiento post-traducciona del proglucagón (PG) resulta en la formación de glucagón, GRPP, un pequeño fragmento de la secuencia llamado IP-1 (péptido intermedio 1) y el fragmento grande del PG y todos estos péptidos son secretados en paralelo en el momento de la estimulación. El procesamiento que ocurre en las células alfa pancreáticas es debido a la prohormona convertasa PC2, que corta el proglucagón como se ha descrito.

En el intestino el procesamiento resulta en la liberación de glicentina (que también puede ser cortado para formar oxyntomodulina), un pequeño fragmento de secuencia llamado IP-2 y GLP-1 y GLP-2. El procesamiento en las células L es debido al corte del péptido del proglucagón por la prohormona convertasa PC 1/3. (Dhanvantari, Izzo et al. 2001). Los primeros estudios sobre la actividad del GLP-1 que se llevaron a cabo en los años 80 estudiaron el péptido en su longitud completa o forma extendida (GLP-1 1-36amida o GLP-1 1-37). Estas moléculas más grandes no presentaban actividad biológica. En 1987 tres grupos independientes demostraron que eliminando los seis primeros aminoácidos se obtenía un GLP-1 más corto pero con actividad biológica (Drucker, Philippe et al. 1987; Kreymann, Williams et al. 1987; Orskov, Holst et al. 1987). Se demostró entonces que la secuencia del GLP-1 necesita otro corte de la PC1/3 (que elimina los aminoácidos de 1 a 6, correspondientes con 72-78 del PG) para la formación del péptido activo GLP-1 (7-37).

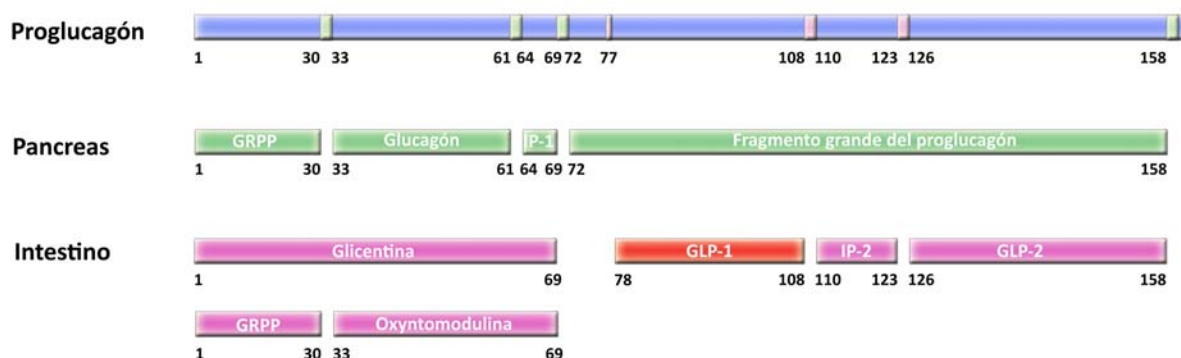


Figura 12: Procesamiento del gen del proglucagón. Las barras de colores en la secuencia del proglucagón representan los sitios de corte de las endopeptidasas. Los números hacen referencia a la posición en la secuencia aminoacídica.

Finalmente, el aminoácido 108 del proglucagón que corresponde a una glicina, situada en la extremidad C terminal del péptido del GLP-1 servirá de sustrato para la amidación de la arginina (posición 107). Las consecuencias de la amidación del GLP-1 no están muy claras. Parece ser que las formas de GLP-1 amidadas (GLP-1 7-36amida) o terminadas en glicina (GLP-1 7-37) presentan el

mismo metabolismo y bioactividad aunque la forma amidada es un poco más resistente a la degradación enzimática en plasma. En humanos la mayor parte del GLP-1 secretado es bajo la forma amida aunque en algunos animales parte del péptido que se secreta es GLP-1 7-37 (Holst 2007).

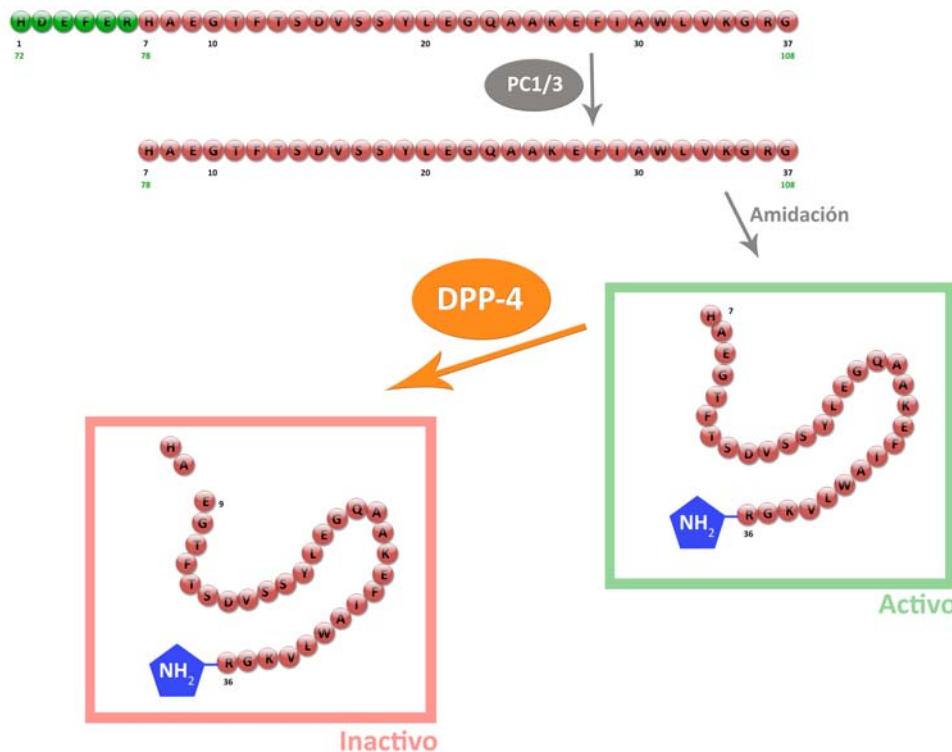


Figura 13: Modificaciones post-traduccionales del GLP-1. El péptido de largo completo 1-37 es procesado por la endopeptidasa PC1/3 para la obtención del GLP-1 7-37. Por amidación se obtiene el GLP-1 7-36amida que representa la mayor parte del GLP-1 secretado en humanos. La DPP-4 es capaz de cortar el GLP-1 entre el segundo y el tercer aminoácido para inactivarlo. En verde numeración del proglucagón y en negro numeración propia del GLP-1.

4.2 Efectos fisiológicos del GLP-1

4.2.1 Secreción de GLP-1

El GLP-1 es secretado en respuesta a la ingesta de nutrientes. En ayunas, las concentraciones plasmáticas de GLP-1 son muy bajas. En cambio, al ingerir alimentos se detecta una rápida secreción de GLP-1 por parte de las células L intestinales. Se cree que es la presencia de nutrientes en la luz intestinal la que causa la secreción de GLP-1, probablemente por interacción directa de los nutrientes con las microvellosidades de las células L. La respuesta secretora varía en función de la cantidad de alimentos que se ingieren y también está muy relacionada con el vaciado gástrico. Cuanto más

Introducción 4 .GLP-1

abundante es una comida y más rápido el vaciado gástrico, mayor secreción de GLP-1. En una comida mixta la concentración de GLP-1 que se obtiene en sangre raramente excederá 50pM (Holst 2007).

4.2.2 Efecto sobre las células beta pancreáticas

El efecto del GLP-1 se produce a consecuencia del abanico de acciones del GLP-1 sobre el organismo entre los cuales los más importantes son los efectos sobre las células beta pancreáticas. En primer lugar el GLP-1 actúa de forma aguda sobre las células beta amplificando la secreción de insulina estimulada por glucosa y en segundo lugar, cuando el estímulo se da de forma más sostenida se promueve un aumento en la síntesis de insulina y por lo tanto del contenido celular en insulina de la célula.

4.2.2.1 Efectos agudos del GLP-1 sobre la secreción de insulina

La activación del receptor del GLP-1 en las células beta pancreáticas desencadena una serie de eventos intracelulares que amplifican la secreción de insulina estimulada por glucosa. La vía intracelular de aumento de la secreción de insulina se inicia con el aumento de AMPc debido a la unión del GLP-1 con su receptor. A partir de ahí se activa la proteína quinasa A y se desencadena un abanico de eventos intracelulares entre los que encontraremos principalmente el cierre de los canales de potasio y el aumento del calcio intracelular que llevarán a potenciar la secreción de insulina.

a) Canales de potasio

El GLP-1 es capaz de modular la actividad de dos de los canales de potasio críticos para la secreción de insulina, K_{ATP} y K_v . El cierre de los canales K_{ATP} es esencial para la despolarización de la célula beta y responsable de la primera fase de la secreción de insulina. El GLP-1 facilita el cierre de los canales en un mecanismo dependiente de PKA. En situación basal, la membrana de las células beta tiene un potencial de membrana de entre -65 y -53mV. La actividad eléctrica se inicia a concentraciones de glucosa de 7-9mM aproximadamente y el potencial de membrana aumenta a -50 -40mV. La aplicación de GLP-1 en presencia de glucosa facilita un aumento del potencial de 5-10mV (Holz, Kühnreiter et al. 1993). Como consecuencia se aumenta la exocitosis de los gránulos de insulina (Doyle and Egan 2007).

Los canales de potasio dependientes de voltaje K_v son los responsables de la repolarización de las células beta después de la secreción. Se abren en respuesta a la despolarización para permitir restablecer el potencial de membrana de la célula beta al estado de equilibrio después de la secreción. Experimentos de patch-clamp en islotes de rata demostraron que tanto GLP-1 como exendina-4 (un agonista del receptor del GLP-1) pueden antagonizar las corrientes K_v . La sensibilidad a voltaje de los canales K_v se modifica de forma que más canales permanecen cerrados después de la despolarización, permitiendo un potencial de acción más largo y por lo tanto una mayor respuesta de secreción de insulina. Este efecto es AMPc/PKA dependiente aunque se cree que sinergiza con la vía PI3K para obtener un efecto íntegro (MacDonald, Wang et al. 2003).

b) Calcio intracelular

Los niveles de calcio intracelular oscilan en respuesta al tratamiento con GLP-1 en células INS-1 en una frecuencia que coincide con las oscilaciones de AMPc intracelular (Dyachok, Isakov et al. 2006). Tanto la activación de la vía de la adenilato ciclasa como la del GLP-1 aumentan el Ca^{2+} intracelular a través de dos mecanismos; en primer lugar por activación parcial del canal de Ca^{2+} de la membrana plasmática VDCC y a continuación aumentando la liberación de calcio de los almacenes intracelulares inducida por Ca^{2+} (CICR, del inglés calcium induced calcium release). La exocitosis de los gránulos de insulina está acoplada al calcio intracelular.

El tratamiento con GLP-1 estimula la liberación de calcio del retículo por un mecanismo dependiente de PKA o bien dependiente de Epac. Ambos mecanismos están aguas abajo de AMPc y se ha demostrado que si no hay aumento de AMPc no hay CICR aún en presencia de concentraciones altas de Ca^{2+} (Kang, Chepurny et al. 2005).

Los canales intracelulares de calcio son del tipo inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃R) o bien del tipo ryanodina (RyR). La activación de IP₃R en respuesta a GLP-1 es PKA dependiente mientras que la activación de RyR se da a través de Epac. Además, el GLP-1 también activa los canales de calcio de tipo L de la membrana plasmática (Doyle and Egan 2007).

c) Metabolismo celular

La oxidación del piruvato por la mitocondria de la célula beta es un paso crítico para la activación de la secreción de insulina. El aumento en la concentración mitocondrial de Ca^{2+} aumenta la respuesta metabólica y secretora de las células beta frente a la glucosa (Wiederkehr and Wollheim 2006). El calcio activa diferentes deshidrogenasas del ciclo del ácido tricarboxílico TCA. El GLP-1 causa

Introducción 4 .GLP-1

aumentos del Ca^{2+} mitocondrial y de ATP mayores de los que podemos observar con glucosa solamente (Tsuboi, da Silva Xavier et al. 2003).

d) Exocitosis de los gránulos de insulina

El GLP-1 aumenta el número de gránulos de insulina listos para ser liberados (RRP del inglés readily releasable pool) gracias a que prolonga la activación de los canales de calcio. También facilita la movilización de los gránulos del pool de reserva en un mecanismo dependiente de AMPc (Doyle and Egan 2007).

4.2.2.2 Efectos crónicos del GLP-1 sobre la síntesis y secreción de insulina

Drucker y colaboradores fueron los primeros en demostrar que el GLP-1 era capaz de aumentar los niveles de ARNm de insulina en un cultivo de células de insulinoma de rata (Drucker, Philippe et al. 1987). En 1992 se demostró que el tratamiento con GLP-1 de células β TC-1 aumentaba el ARNm de la insulina, así como el contenido de insulina (Fehmann and Habener 1992). El tratamiento prolongado de células de insulinoma de rata con GLP-1 resultó en un aumento de una vez y media del contenido intracelular de insulina (Wang, Egan et al. 1995).

El aumento de la expresión de insulina está causada en parte por la estabilización del transcrito de la insulina. Se ha demostrado que el GLP-1 estimula la localización nuclear de PTB1 que se une al mRNA de la proinsulina para estabilizarlo (Knoch, Meisterfeld et al. 2006).

El elemento regulador CRE permite la activación de la transcripción de genes en respuesta a niveles elevados de AMP cíclico. La proteína CREB (del inglés CRE binding) necesita ser fosforilada para formar un complejo con CBP (del inglés CREB binding protein) y entonces unirse a la secuencia CRE del promotor de un gen para regular su expresión. El gen de la insulina humana contiene cuatro sitios CRE, de los que por lo menos tres son esenciales para la inducción de la transcripción del gen de la insulina por GLP-1 (Hay, Sinclair et al. 2005). Como ya detallamos en la sección 4.3.4.1 d) el calcio intracelular también promueve la transcripción del gen de la insulina permitiendo la unión al promotor de NFAT.

El factor de transcripción PDX-1 es esencial durante el desarrollo embrionario y para la regulación de la transcripción del gen de la insulina. Además la expresión de PDX-1, su localización intracelular y su unión al DNA son determinantes para el metabolismo de la glucosa en la célula beta. Finalmente, PDX-1 regula la inducción del gen de la insulina estimulada por glucosa (Rafiq, Kennedy

et al. 1998) ya que se ha demostrado que tiene varios sitios de unión en el promotor del gen de la insulina (Doyle and Egan 2007). PDX-1 es además un efector clave de la vía de GLP-1R y es crítico para los efectos positivos de los agonistas del GLP-1R sobre diferenciación, proliferación, supervivencia y función de la célula beta (Li, Cao et al. 2005). En respuesta al tratamiento con GLP-1 en células de insulinoma de rata tanto los niveles de mRNA como de la proteína PDX-1 se incrementan (Buteau, Roduit et al. 1999; Wang, Cahill et al. 1999). El tratamiento crónico con agonistas del GLP-1 provoca el aumento de expresión de PDX-1 en el páncreas tanto endocrino como exocrino y también aumenta la translocación nuclear del PDX-1 en las células beta (Stoffers, Kieffer et al. 2000). El efecto del GLP-1 sobre PDX-1 se inhibe parcialmente con un inhibidor de la PKA (Wang, Zhou et al. 2001) y también con un inhibidor de la PI3K (Buteau, Roduit et al. 1999) indicando que probablemente las dos vías de señalización están implicadas en promover la síntesis de PDX-1. El mecanismo por el cual el GLP-1 induce la localización nuclear del PDX-1 implica la fosforilación de un miembro de la familia de factores de transcripción forkhead (Fox) de la subclase O, en concreto FoxO1. En el estado fosforilado FoxO1 es citoplasmático y PDX1 y FoxO1 se excluyen mutuamente del núcleo de la célula (Buteau, Spatz et al. 2006).

4.2.2.3 Inhibición de la secreción de glucagón

El GLP-1 induce una fuerte inhibición de la secreción de glucagón (Orskov, Holst et al. 1988) aunque el mecanismo no está totalmente dilucidado. La insulina es un factor clave que inhibe la secreción de glucagón y aumentos locales de insulina en la proximidad de las células alfa podrían inhibir la secreción de forma paracrina. Sin embargo, en pacientes con diabetes tipo 1, sin masa beta residual (ausencia de péptido C) el GLP-1 sigue siendo capaz de inhibir la secreción de glucagón, sugiriendo que otros mecanismos deben estar implicados (Creutzfeldt, Kleine et al. 1996).

El GLP-1 es capaz de estimular la liberación de somatostatina que a su vez podría estar inhibiendo la de glucagón de forma paracrina, como lo demuestra la capacidad inhibidora del efecto del GLP-1 de anticuerpos anti-somatostatina y de un antagonista del receptor de somatostatina (de Heer, Rasmussen et al. 2008).

Cabe remarcar que la presencia de receptores de GLP-1 en las células alfa es un tema controvertido pero ciertos autores defienden su existencia y han publicado que la estimulación con GLP-1 de células alfa aisladas resulta en la secreción de GLP-1 (Ding, Renström et al. 1997).

Introducción 4 .GLP-1

4.2.2.4 Inhibición de la secreción y motilidad gastrointestinal

En un principio se describió que el GLP-1 inhibía la secreción de ácido gástrico inducida por gastrina y más adelante se demostró que el GLP-1 también inhibía la secreción ácida inducida por la ingesta, así como el vaciado gástrico y las secreciones exocrinas del páncreas.

La inhibición de la secreción de ácido por GLP-1 se suma al efecto inhibitorio de PYY, que es secretado por las células L en paralelo al GLP-1. GLP-1 y PYY serían por tanto las hormonas mediadoras del “freno ileal”, que consiste en la inhibición endocrina de la parte superior del sistema gastrointestinal por la presencia de nutrientes no absorbidos en el íleo. Las acciones del GLP-1 sobre el tracto digestivo están mediadas vía vagal (Holst 2007).

4.2.2.5 Inducción de saciedad

La administración de GLP-1 como de liraglutida reducía la ingesta de alimentos en ratas normales y diabéticas (Larsen, Fledelius et al. 2001). Varios estudios han demostrado que la infusión de GLP-1 induce saciedad y reduce la cantidad de comida ingerida de forma dosis dependiente en sujetos sanos (Flint, Raben et al. 1998; Verdich, Flint et al. 2001). Este efecto está preservado en personas obesas así como en pacientes con diabetes tipo 2 obesos. Los ensayos clínicos a medio plazo indican que la inyección subcutánea de los análogos del GLP-1, exenatida y liraglutida da lugar una pérdida de peso gradual y lineal y el mantenimiento de la eficacia (Blonde, Klein et al. 2006; Astrup, Rössner et al. 2009). El mecanismo por el cual la administración de GLP-1 induce saciedad no está claro. La interacción con neuronas sensoriales del tracto digestivo podría estar involucrada. Otra posibilidad sería que el GLP-1 administrado exógenamente actúe sobre los núcleos hipotalámicos que regulan la ingesta a nivel cerebral (Holst 2007).

4.2.2.6 Otros efectos

Se han descrito receptores de GLP-1 en el corazón (Campos, Lee et al. 1994; Bullock, Heller et al. 1996). En situación de daño por isquemia-reperfusión el GLP-1 reduce el tamaño del infarto y tiene un efecto protector (Holst 2007). Además también tiene efectos antihipertensivos y vasodilatadores (Yu, Moreno et al. 2003). El GLP-1 aumenta el consumo de glucosa por los cardiomiocitos e inhibe la contractibilidad del corazón, modula la frecuencia cardíaca y el tono vascular (Grieve, Cassidy et al. 2009). En el endotelio de la arteria pulmonar y coronaria se ha

detectado la expresión del receptor (Richter, Feddersen et al. 1993; Ban, Noyan-Ashraf et al. 2008; Erdogdu, Nathanson et al. 2010).

En los pulmones también se encuentran receptores del GLP-1. La función de GLP-1 a nivel pulmonar es desconocida aunque se describió que inducía la secreción de macromoléculas por parte de las células neuroendocrinas (Holst 2007).

GLP-1 tiene acciones neurotrópicas. La administración intracerebroventricular de GLP-1 se ha asociado con mejoría en el aprendizaje (en ratas) y con efectos neuroprotectores, por lo que se propuso como agente terapéutico para enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer (Holst 2007).

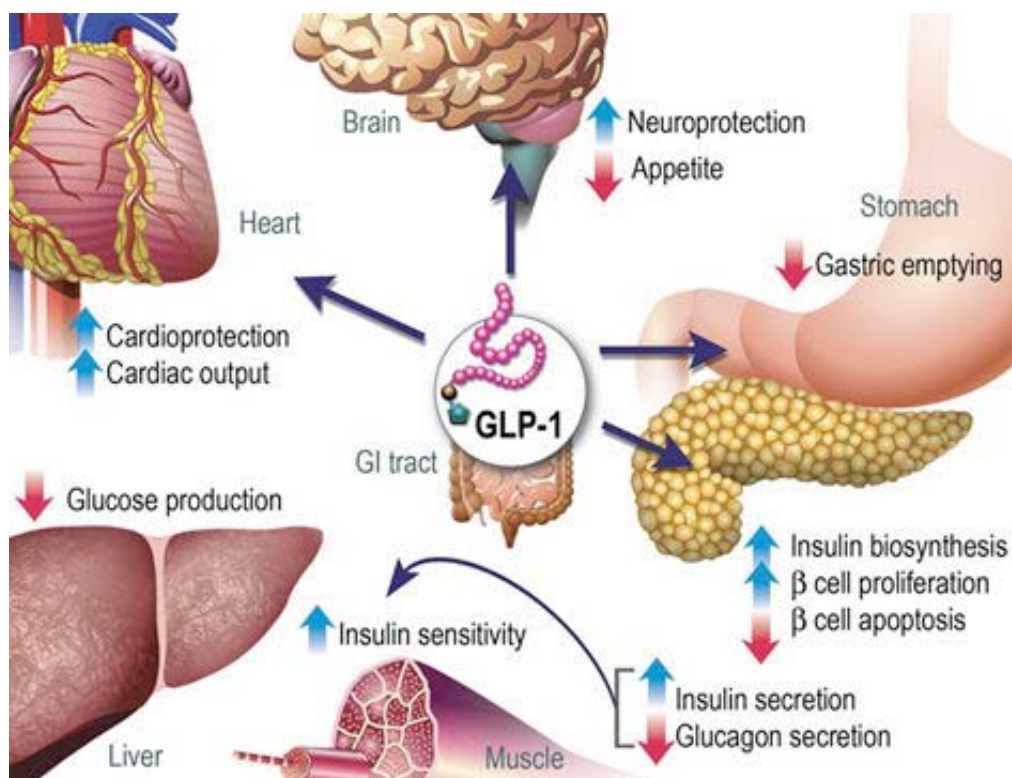


Figura 14: Acciones fisiológicas del GLP-1 sobre los diferentes órganos.

Adaptada de (Drucker 2006)

Introducción 4 .GLP-1

4.3 Señalización y receptor

4.3.1 El receptor de GLP-1

El receptor de GLP-1 es un receptor específico de 7 dominios transmembrana asociado a proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), con las siglas GPCR del inglés G-protein coupled receptor. Fue clonado por primera vez a partir de islotes pancreáticos de rata (Thorens 1992). Forma parte de la clase B de receptores asociados a proteínas G, la misma a la que pertenecen varios receptores de hormonas clásicos. Dentro de la clase B, los receptores de hormonas peptídicas forman la subclase de la familia del receptor del glucagón que incluye los receptores de glucagón, GLP-2, GIP, hormona liberadora de la hormona del crecimiento y secretina (Doyle and Egan 2007). Aunque el GLP-1, GLP-2 y glucagón están codificados por el mismo gen y proceden de modificaciones postraduccionales del proglucagón (ver apartado 4.1), la unión del péptido del GLP-1 con su receptor es muy específica con ninguna reactividad cruzada relevante con receptores para otros péptidos. La única excepción es el glucagón que es capaz de unirse al GLP-1R con una afinidad entre 100 y 1000 veces menor que el GLP-1 (Thorens 1992; Fehmann, Jiang et al. 1994). De todas formas, tanto en roedores como en humanos los niveles plasmáticos de glucagón nunca alcanzan niveles necesarios para que su acción sobre el receptor de GLP-1 pueda tener importancia. Todos los miembros de GPCR de la familia del glucagón están asociados a la subunidad $G\alpha_s$ que subsecuentemente activa la adenilato ciclasa (AC) y la producción de AMP cíclico (cAMP) aunque algunos de ellos, entre los que se encuentra el GLP-1R son capaces de señalar a través de otros tipos de subunidades de proteínas G.

4.3.2 Desensibilización del GLP-1R

La fosforilación de tres parejas de serinas se ha asociado con la internalización del receptor del GLP-1 y con la desensibilización de este. Con el objetivo de estudiar la desensibilización del GLP-1R Baggio y colaboradores utilizaron la línea INS-1 pretratada durante diferentes intervalos con exendina-4 (Ex-4). Luego dejaban 1h de descanso a las células y volvían a estimular con exendina-4. Demostraron una regulación a la baja de la respuesta medida como producción de cAMP. Por otra parte trabajaron con unos ratones transgénicos que expresaban la exendina-4 en muchos de sus tejidos (MT-Ex-4) y que por lo tanto presentaban niveles elevados de Ex-4 en sangre y en los que potencialmente los receptores de GLP-1 estarían desensibilizados. Sometieron a estos ratones a un test intraperitoneal de glucosa y a un test oral inmediatamente después de haberles inyectado intraperitonealmente exendina-4. En el test oral la exendina-4 mejoraba la tolerancia a la glucosa

tanto en animales salvajes como en los transgénicos, sugiriendo que los receptores de GLP-1 no estaban desensibilizados. Sin embargo, en el test intraperitoneal, la exendina-4 perdía la capacidad de reducir el área bajo la curva de la glucosa (AUC) en los transgénicos MT-Ex-4. Los autores sugerían que este efecto podría ser consecuencia de una desensibilización a nivel del vaciado gástrico pero no a nivel de la secreción de insulina (Baggio, Kim et al. 2004). Sin embargo, en los ensayos clínicos en los que se provoca un aumento crónico de la cantidad de GLP-1 en plasma éste ha resultado en una reducción efectiva de los niveles de glucosa sin que se observe ningún síntoma de pérdida de efectividad por parte del GLP-1 administrado. Lo que indicaría entonces que la desensibilización homóloga o heteróloga *in vivo* del receptor del GLP-1 no tiene relevancia fisiológica (Doyle and Egan 2007) .

4.3.3 Expresión del GLP-1R

El receptor de GLP-1 se expresa en islotes pancreáticos, cerebro, pulmón, corazón, riñón y tracto gastrointestinal (Campos, Lee et al. 1994; Bullock, Heller et al. 1996). En cuanto a la distribución del GLP-1R en el páncreas existe gran cantidad de estudios que intentan clarificarlo y que en más de una ocasión se contradicen.

Los primeros experimentos de hibridación *in situ* describían una expresión muy marcada en el centro de los islotes (Bullock, Heller et al. 1996). Sin embargo, estudios por autorradiografía de GLP-1 marcado describieron sitios de unión en las células α , β y δ de los islotes (Orskov and Poulsen 1991; Heller and Aponte 1995)

Más adelante, Moens et al por Western Blot solamente detectaban GLP-1R en las células beta (Moens, Heimberg et al. 1996) mientras que en 1997 Heller et al afirmaban (estudios de inmunohistoquímica) que el 76% de la células somatostatina positivas también se teñían por GLP-1R así como el 20% de las positivas para glucagón (Heller, Kieffer et al. 1997).

Más recientemente, una combinación de hibridación *in situ* e inmunocitoquímica fue utilizada para determinar cuales son las células que expresan el receptor del GLP-1 en el páncreas de rata, ratón y humanos. El receptor de GLP-1 fue localizado en las células ductales y beta pancreáticas con muy poca expresión en los demás tipos celulares del islote (Tornehave, Kristensen et al. 2008).

En cuanto al patrón de expresión temporal del receptor del GLP-1 se ha demostrado que las células beta de rata alcanzan los niveles adultos de mRNA del *glp1r* hacia el día postnatal 28 (Aguayo-Mazzucato, Koh et al. 2010). En el momento de nacer, los islotes de las ratas expresan niveles de GLP1R muy bajos, que irán aumentando de forma significativa entre los días 7 y 9.

Introducción 4 .GLP-1

El factor de transcripción MAFA, clave en la maduración de la célula beta controla la expresión génica del GLP1R. Por una parte se ha comprobado que su sobreexpresión induce un aumento de la transcripción del gen *glp1r* en una línea celular (Wang, Brun et al. 2007) y en islotes neonatales (Aguayo-Mazzucato, Koh et al. 2010)

La expresión del receptor del GLP-1 puede ser regulada por diferentes factores. En islotes pancreáticos sometidos a alta glucosa (20mM) o a dexametasona el mRNA del GLP-1R decae. Sin embargo, su expresión no se modifica frente a cambios en el cAMP intracelular (Abrahamsen, Lundgren et al. 1995).

El impacto de la hiperglucemia *in vivo* sobre la expresión del GLP-1R fue estudiada en ratas pancreatectomizadas y en ratones db/db. Tanto el mRNA del receptor como la proteína inmunoreactiva se reducían en las ratas hiperglucémicas parcialmente pancreatectomizadas, y los niveles de mRNA y proteína se restablecían al normalizar los niveles de glucosa sanguínea con phlorizina. En ratones db/db de larga evolución también se confirmó la regulación a la baja del receptor de GLP-1. PKC α estaría implicada en la reducción de la expresión de GLP-1R por alta glucosa (Xu, Kaneto et al. 2007)

4.3.4 Señalización

La unión del receptor de GLP-1 con su ligando en las células beta desencadena la activación de segundos mensajeros que a través de diferentes vías de señalización permiten, por una parte, aumentar la secreción de insulina y por la otra, promover el crecimiento y supervivencia de las células beta.

4.3.4.1 Estimulación de la producción de AMPc

La acción insulínica del GLP-1 es consecuencia de la interacción del GLP-1 con las células beta a través del receptor del GLP-1 (Scrocchi, Brown et al. 1996). La unión del GLP-1 con su receptor causa la activación, a través de una proteína G estimuladora $G_{s\alpha}$ de la adenilato ciclasa (AC) que induce la producción de Adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Drucker, Philippe et al. 1987). El tratamiento de células beta aisladas de rata con GLP-1 (10mM) en presencia de baja (1,4mM) o alta (20mM) glucosa aumenta la acumulación de AMPc durante una incubación estática de 15 minutos (Delmeire, Flamez et al. 2003). El AMPc es el principal mediador de la acción del GLP-1 en los eventos moleculares que promueven la secreción de insulina. Se ha demostrado que la sobreexpresión del GLP-1R en una línea celular de células beta aumenta los niveles basales de cAMP (Montrose-Rafizadeh, Wang et al. 1997).

El AMPc activa vías de señalización que regulan la función beta y entre ellas las de PKA y Epac, que detallaremos más adelante.

4.3.4.2 Activación de la proteína quinasa A (PKA)

El aumento de AMPc resultante de la activación del receptor de GLP-1 acoplado a proteína G activa la proteína quinasa A (PKA), una enzima ubicua fosforiladora de serina/treonina (Taylor, Buechler et al. 1990). En el estado inactivo, el holoenzima PKA está formado por una subunidad reguladora unida no covalentemente con 2 subunidades catalíticas. Existen al menos cuatro unidades reguladoras diferentes (RI α , RI β , RII α , RII β) con diferentes afinidades para el AMPc. Existen 3 unidades catalíticas C α , C β y C γ . Cuando cuatro moléculas de AMPc se unen al dímero de la subunidad reguladora (2 a cada subunidad) hay un cambio conformacional que resulta en la disociación del complejo. La PKA es un componente clave en la regulación de la secreción de insulina por AMPc. Es la responsable de muchas de las fosforilaciones que se requieren para llevar a cabo la secreción en las células beta. La inhibición de la PKA en islotes aislados y en líneas de insulinoma disminuye la secreción de insulina mediada por glucosa y por GLP-1 (Wang, Zhou et al. 2001). El tratamiento de células β TC6 con GLP-1 estimula la translocación de PKA al núcleo determinado por microscopía confocal (Gao, Young et al. 2002).

Muchos sustratos de la PKA participan en la secreción de insulina. Entre ellos se incluyen, el receptor de IP₃ del retículo endoplasmático, el transportador de glucosa GLUT-2 y los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}).

4.3.4.3 Factor de intercambio de nucleótidos de guanina dependiente de AMPc

En los islotes entre un 40 y 50% de la secreción de insulina estimulada por GLP-1 es resistente al tratamiento con el inhibidor de la PKA H89 implicando que existe otra vía mediadora de señales intracelulares dependiente de AMPc (Kashima, Miki et al. 2001). Esta vía PKA independiente es la de proteínas de intercambio directamente asociadas a AMPc, también denominada factor de intercambio de nucleótidos de guanina dependiente de AMPc o Epac (del inglés Exchange proteins directly associated with cAMP). Forma parte de una familia de efectores no quinasa inicialmente descritos como activadores de GEF (factores de intercambio de nucleótidos de guanina, del inglés guanine nucleotide exchange factors). Existen dos variantes de Epac que muestran alta especificidad por AMPc. La Epac es sensible a AMPc en un rango en el que la PKA ya está saturada lo que tiene una gran importancia en la relevancia fisiológica de la vía. En un estudio sobre los efectos protectores de los activadores de AMPc frente a la apoptosis inducida por palmitato en células RINm5F se demostró que la protección era conferida por un mecanismo dependiente de Epac (Kwon, Pappan et al. 2004).

Introducción 4 .GLP-1

Epac también está involucrado en la liberación de calcio por el retículo endoplásmico y sus dianas aguas abajo son importantes para la exocitosis de los gránulos secretores de insulina.

4.3.4.4 Vía calcio/calmodulina

La CaM quinasa II es un miembro de la familia de quinasas dependientes de calcio. Al activarse por altas concentraciones de Ca^{2+} (Easom 1999), el enzima se autofosforila y adquiere afinidad por la calmodulina. Se sabe que el GLP-1 activa la CaM quinasa II ya que aumenta los niveles de Ca^{2+} intracelular al activar los canales de calcio dependientes de voltaje de tipo L y la liberación de calcio del ER (Doyle and Egan 2007).

La calcineurina o PP2B es una serina/treonina fosfatasa activada por CaM. Es capaz de desfosforilar el factor de transcripción nuclear de células T activadas (NFAT) y permitir su translocación al núcleo (Rao, Luo et al. 1997). La inhibición de calcineurina (por ciclosporina o FK506) disminuye la transcripción del gen de la insulina inducido por GLP-1 al eliminar la unión de NFAT al promotor de la insulina (Lawrence, Bhatt et al. 2002).

4.3.4.5 Proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)

Estudios de sobreexpresión del receptor de GLP-1 en células CHO demostraron que el GLP-1R también puede estar asociado a las subunidades de proteína G, $G_{q/11}$, y en menor medida $G_{i1,2}$, lo que llevaría a la activación de la vía de MAPK (Montrose-Rafizadeh, Avdonin et al. 1999). Estudios más recientes demostraron que la activación de las vías MAPK por GLP-1 también podían ser mediadas por AMPc. En concreto, las quinasas reguladas por señales extracelulares ERK 1 y 2 se activan de forma dependiente a Ca^{2+} (Gomez, Pritchard et al. 2002; Arnette, Gibson et al. 2003) y cAMP (Park, Dong et al. 2006). ERK1 y ERK2 son los enzimas terminales de una cascada de 3 enzimas, compuesta por las Raf quinasas, que activan las quinasas de ERK y MAPK llamadas MEK1 y MEK2 que a su vez activan ERK1/2. La fosforilación de ERK1/2 en respuesta al tratamiento con GLP-1 ha sido demostrado en líneas de insulinoma (Gomez, Pritchard et al. 2002; Arnette, Gibson et al. 2003) y más recientemente por GLP-1 (Trümper, Ross et al. 2005) y exendina 4 (Park, Dong et al. 2006) en islotes humanos.

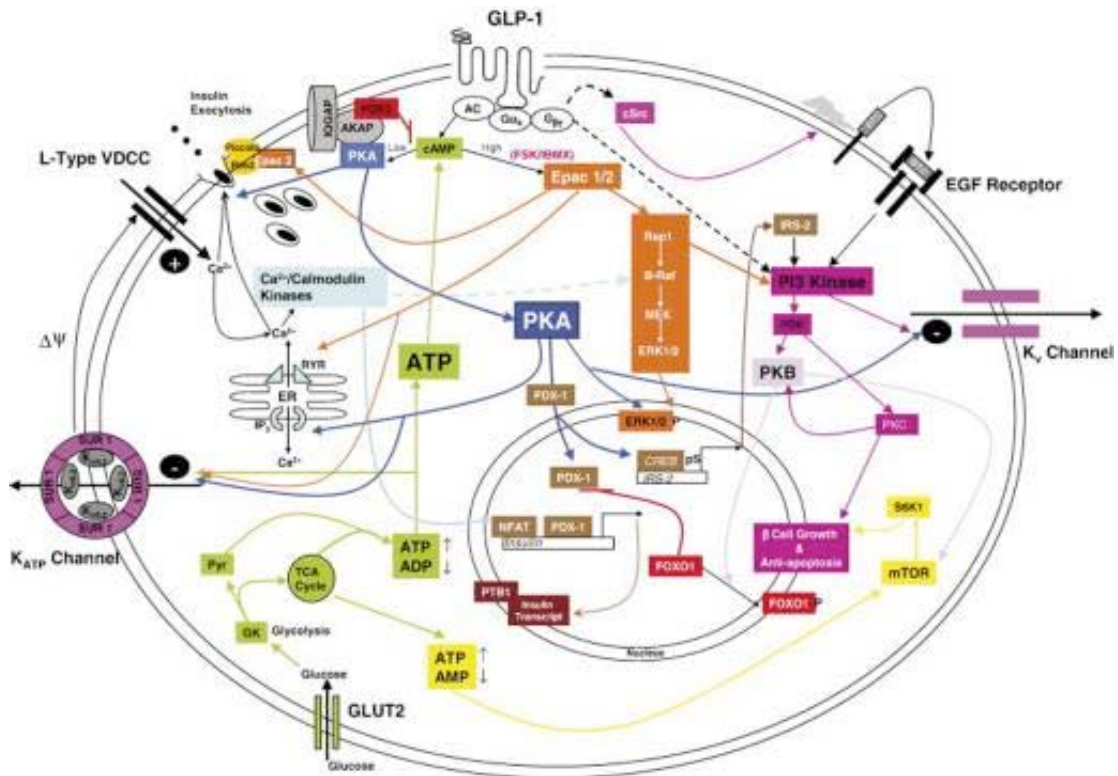


Figura 16: Principales vías de señalización activadas por GLP-1R. La unión de un agonista del GLP-1R causa un aumento de AMPc que conlleva la activación de la PKA y de Epac. Los niveles de AMPc también aumentan gracias al aumento de ATP provocado por la metabolización de la glucosa. En núcleo la PKA regula PDX-1 y CREB. La unión del GLP-1 con su receptor produce, de manera sinérgica con la glucosa, el cierre de los canales de K⁺ dependientes de ATP, facilitando de esta manera la despolarización de la membrana y la inducción de actividad eléctrica. El aumento de la concentración citosólica de calcio promueve la reacción exocítica que se ve potenciada por las altas concentraciones de cAMP. Las flechas en punteado indican vías que no han sido del todo demostradas. *Adaptada de (Doyle and Egan 2007)*

La activación de PI3K está implicada en una multitud de eventos en las células beta incluyendo crecimiento, supervivencia, metabolismo y regulación de canales. La activación de PI3K por GLP-1 es compleja y está regulada por diferentes vías de señalización integradas. La PI3 quinasa es capaz de reclutar las serina/treonina quinasas PDK1 (quinasa 1 dependiente de fosfatidilinositol) y PKB a la membrana plasmática. Una vez allí la formación de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) activa PDK1 que es capaz de fosforilar para activarla PKB (Lawlor and Alessi 2001). Muchos efectores aguas abajo de PDK1 se encuentran fosforilados después de la estimulación de células MIN6 con GLP-1 (MacDonald, Wang et al. 2003). La fosforilación de PKB en la serina 473 y treonina 308 se demostró en células INS-1 después del tratamiento con GLP-1 (Trümper, Trümper et al. 2000). La PKB es un elemento clave en la regulación de la proliferación y supervivencia de las células beta (Bernal-Mizrachi, Wen et al. 2001; Tuttle, Gill et al. 2001).

Introducción 4 .GLP-1

La PI3K también se encuentra aguas abajo del sustrato 2 del receptor de insulina (IRS2) (ver apartado 4.2). Hay evidencias de que el GLP-1 puede activar a IRS2 ya que el aumento de la fosforilación de tirosinas de IRS2 se observó después de 10 minutos de tratamiento con GLP-1 en células INS-1 (Trümper, Trümper et al. 2000). Además la activación del GLP-1R por exendina-4 aumentaba la expresión de IRS2 vía la unión del elemento de respuesta al AMPc (CRE) al promotor de IRS2 (Jhala, Canettieri et al. 2003). En islotes humanos estimulados con exendina-4 se detecta aumento de la fosforilación de IRS2 y PKB (Park, Dong et al. 2006). No está muy clara cual es la relación entre PKB, IRS2 y la vía ERK1/2. IRS2 parece estimular la fosforilación de PKB pero no hay consenso en que sea capaz de inducir la cascada de ERK (Doyle and Egan 2007).

Otra vía de activación de PI3K mediada por GLP-1 podría ser por activación de la tirosina quinasa Scr (Buteau, Foisy et al. 2003), que es un efector de la proteína G $\beta\gamma$ y que puede ser un mecanismo importante en la inducción de la proliferación por GLP-1.

Un elemento de la vía de señalización por PI3K es la diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR). mTOR podría activarse directamente por PKB aunque los mecanismos de regulación de esta molécula son complejos (Kwon, Marshall et al. 2004). mTOR se fosforila y se activa en respuesta al aumento de los niveles de AMPc en respuesta a exendina-4. Esto es consecuencia del aumento de los niveles de ATP, que desactivan los canales KATP que son los que regulan directamente la activación de mTOR. Los efectos de mTOR en las células beta son complejos, sin embargo se sabe que está implicado en el aumento de proliferación mediado por GLP-1R (Kwon, Marshall et al. 2004).

4.4 Formas farmacológicas del GLP-1

El mayor inconveniente para el uso clínico de GLP-1 es su corta vida media biológica debido a la rápida inactivación por la ubicua proteasa dipeptidil peptidasa IV (DPP-4) y el aclaramiento renal, lo que ha dado lugar por una parte al desarrollo de inhibidores de DPP-4 que prolongan la vida media del GLP-1 endógeno y por otra al de análogos de larga duración del GLP-1 resistentes a la acción de DPP-4 (Deacon 2004). Estos agentes GLP-1 miméticos se unen al receptor de GLP-1 (GLP-1R) con afinidad similar al GLP-1 y dan lugar a acciones biológicas idénticas a la del GLP-1 nativo pero dan lugar a una activación sostenida del GLP-1R.

La exendina-4 (Ex-4,) es un agonista del GLP-1R sintetizado en las glándulas salivares de *Heloderma suspectum* o monstruo de Gila (Eng, Kleinman et al. 1992). Exenatida es la versión sintética de la exendina-4. La exendina-4 es mucho más potente que el GLP-1 nativo, principalmente

debido a su resistencia a la inactivación por la DPP-4. A diferencia del GLP-1, que tiene una alanina en la posición 2, exendina-4 presenta una glicina en la posición 2, que no es sustrato de la DPP-4 y por lo tanto tiene una vida media *in vivo* mucho más larga, de 2,4h frente a los 1,5 minutos del GLP-1 nativo. En abril del 2005 la FDA (US Food and Drug Administration) aprobó la utilización de exenatida, para el tratamiento de pacientes de diabetes tipo 2 y desde su introducción ha sido utilizado por más de un millón de pacientes. Exenatida se administra de forma subcutánea entre 30 y 60 minutos antes de las 2 comidas principales del día. El uso de exenatida está aprobado como terapia adjunta para mejorar el control metabólico de pacientes de diabetes de tipo 2 que están tomando metformina o una combinación de metformina y sulfonilurea pero que tienen un pobre control glucémico. Desde octubre de 2009 también ha sido aprobado como monoterapia en los Estados Unidos de America.

Liraglutida (o NN2211) es el segundo agonista del GLP-1R comercializado. Ha sido aprobado por la FDA y por la agencia europea del medicamento (EMA). El fármaco es un análogo humano del GLP-1 y su secuencia de aminoácidos presenta un 97% de homología con la hormona humana. Según el fabricante su vida media es de 13-15h y alcanza su concentración máxima a las 8-12h tras su administración (Agersø, Jensen et al. 2002; Elbrønd, Jakobsen et al. 2002). Esta prolongación de la vida media se consiguió al añadir una cadena de ácidos grasos a la molécula de GLP-1. Esta cadena permite a la molécula unirse a la albúmina circulante o presente en los tejidos subcutáneos. La forma activa de GLP-1 se va liberando entonces de forma continuada de las moléculas de albúmina. Además, la unión con la albúmina también reduce la velocidad de degradación y de eliminación renal.

Liraglutida ha sido testado en varios ensayos clínico que incluyeron a más de 6500 pacientes. Se administra una sola vez al día, lo que le confiere un cierta ventaja frente a exenatida. Liraglutida está indicado para el para el tratamiento de adultos con diabetes de tipo 2 para mejorar su control metabólico en combinación con metformina sola o bien con metformina y sulfonilurea o metformina y thiazolidinediona.

Otros agonistas del receptor de GLP-1 están en desarrollo como el Albiglutide, Lixisenatide, Exenatida-LAR (en estudios de fase III) y se administrarían una vez a la semana.

Otra estrategia farmacológica para el uso terapéutico de GLP-1 está basada prolongar la vida media del GLP-1 endógeno mediante la utilización de inhibidores de la DPP-4. Al provocar la inhibición de la proteasa se protege al GLP-1 circulante de la degradación y su nivel plasmático no

Introducción 4 .GLP-1

decae con tanta rapidez. Diversos fármacos inhibidores de DPP-4 ya están en el mercado, como la sitagliptina, la vidagliptina y la saxagliptina, y diversos compuestos más se encuentran en fase de desarrollo.

4.5 Regulación de la masa beta y GLP-1

4.5.1 Efectos del GLP-1 in vitro

4.5.1.1 GLP-1 y proliferación de células β in Vitro

En 1999, Buteau y colaboradores demostraron que el tratamiento de islotes pancreáticos de rata con GLP-1 durante 24 horas aumentaba la síntesis de DNA, medida por incorporación de timidina tritiada (Buteau, Roduit et al. 1999).

Los mecanismos por los que la activación de GLP-1R aumenta la masa beta son diversos y no totalmente conocidos. Un elemento común a las acciones proliferativas, antiapoptóticas y neogénicas es la activación del factor de transcripción PDX-1 (duodenal homeobox factor-1) (Li, Cao et al. 2005) esencial en el desarrollo pancreático y para la función beta.

Varios estudios propusieron que el mecanismo por el que el GLP-1 induce la proliferación de las células beta es a través de la activación de PI3K (Phosphatidylinositol 3'-kinasa) y de la translocación al núcleo de su efector aguas abajo proteína quinasa-C ζ (Buteau, Foisy et al. 2001).

En una provocativa publicación del año 2003 se demostró que los efectos proliferativos del GLP-1 eran suprimidos por la adición de un inhibidor del receptor de EGF (Epidermal Growth Factor) y sugerían que el GLP-1 actuaba transactivando el receptor de EGF. Se hipotetizó que c-src promueve la fosforilación del EGFR a través de la liberación de la betacelulina (ligando del EGFR) asociada a la membrana plasmática (Buteau, Foisy et al. 2003).

Los mecanismos aguas abajo de la activación del receptor de GLP-1 incluirían también la desactivación de FoxO1, un efector transcripcional de la señalización por insulina y de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) (Buteau, Spatz et al. 2006).

El factor de transcripción dependiente de cAMP (CREB) también ha sido apuntado como uno de los efectores de las acciones proliferativas del GLP-1, como queda reflejado en el estudio de Jhala (Jhala, Canettieri et al. 2003).

4.5.1.2 GLP-1 y neogénesis de células β in vitro

Los estudios *in vitro* para determinar la capacidad de los agonistas del GLP-1R para inducir diferenciación se han llevado a cabo en líneas celulares ductales o acinares, en las que se ha probado la capacidad de las células para expresar hormonas. La expresión del factor de transcripción PDX-1 también es importante en el proceso de diferenciación de células ductales a células beta.

Cuando la línea de células ductales de rata AR42J era tratada durante 3 días con GLP-1 aparecían células productoras de insulina y de glucagón. La diferenciación se podía inducir parcialmente con tratamiento con forskolina (mimético de la adenilato ciclasa) y se bloqueaba por tratamiento con el inhibidor de MEK PD98059. Se determinó entonces que el mecanismo de diferenciación era codependiente de las vías de PKA y de MEK/ERK. La PKC también parece estar implicada aunque aún no se ha investigado qué isoforma tendría relevancia (Zhou, Wang et al. 1999).

Un estudio del 2004 también consiguió diferenciar a fenotipo beta células exocrinas AR42J con un tratamiento de 3 días con exendina-4 (Yew, Prasad et al. 2004). Se demostró que la vía del TGF β , y las proteínas asociadas a ésta Smad 2 y Smad 3 también estaban implicadas en la inducción de diferenciación con exendina-4. Más adelante demostraron la implicación de la proteína morfogenética del hueso (BMP del inglés Bone Morphogenetic Protein), que también forma parte de la familia de TGF β (Yew, Hembree et al. 2005).

En un estudio en el se trataban con exendina-4 células ductales humanas Capan-1 se demostró que por una parte aumentaba el número de células insulina-positivas en el cultivo y por otra aumentaba la expresión de PDX-1 así como la translocación nuclear del mismo (Zhou, Pineyro et al. 2002).

Rabinovitch y colaboradores transplantaron islotes humanos con baja proporción de células endocrinas a ratones NOD inyectados con STZ. Trataron a los animales con una combinación de GLP-1 y gastrina y observaron una mejora en la hiperglucemia de los animales acompañada de un aumento de los niveles de C-péptido humano. A nivel histológico reportaron un aumento de cuatro veces de la cantidad de insulina y la aparición de gran cantidad de células citoqueratina positivas que también expresaban insulina (Suarez-Pinzon, Lakey et al. 2008).

4.5.1.3. GLP-1 y apoptosis de células β in vitro

Ha sido demostrado que el GLP-1 es capaz de proteger a las células beta de la apoptosis inducida por un gran variedad de estímulos. El tratamiento con GLP-1 de diferentes líneas celulares de células beta protegía de la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno (Hui, Wright et al. 2001; Kwon, Pappan et al. 2004), por ácidos grasos como el palmitato (Kwon, Pappan et al. 2004), por

Introducción 4 .GLP-1

agentes inmunosupresores como la dexametasona (Ranta, Avram et al. 2006) o por citoquinas pro-inflamatorias (Li, El Kholly et al. 2005). Las acciones antiapoptóticas del GLP-1 son mediadas por la activación de la proteína quinasa B (PKB o AKT) (Wang, Li et al. 2004) y ha sido hipotetizado que por unión del NF- κ B al DNA (Buteau, El Assaad et al. 2004).

4.5.2 Efectos del GLP-1 o sus análogos sobre la masa beta de modelos murinos de diabetes

La primera evidencia de que los agonistas del GLP-1R presentan acciones mitogénicas sobre las células beta *in vivo* se dio en un estudio en el que se administró exendina-4 a ratas a las que se les había practicado una pancreatectomía subtotal. Los animales pancreatectomizados que recibieron el tratamiento con GLP-1 mostraron una mejor tolerancia a la glucosa y una masa beta superior. Se describió un aumento de la proliferación de las células beta en los animales sham tratados con GLP-1 respecto a los sham no tratados, aunque no se observó un aumento de la proliferación en los animales pancreatectomizados tratados respecto a los no tratados (Xu, Stoffers et al. 1999). La hipótesis de los autores fue que el aumento de masa beta era debido a un aumento de la neogénesis.

Las ratas Wistar presentan una pérdida gradual de la función beta con la edad y una progresiva intolerancia a la glucosa. El tratamiento continuo con GLP-1 a ratas Wistar de 22 meses de edad restauró la tolerancia a la glucosa e incrementó la expresión de PDX-1 en los islotes y en el páncreas entero. Se observó un aumento en el número de células insulina positivas en los ductos así como un aumento de la replicación acinar y ductal. El estudio sugería que el GLP-1 promovía la proliferación de células acinares y ductales, donde posteriormente se expresaba el PDX-1 y en consecuencia se inducía su diferenciación a células beta (Perfetti, Zhou et al. 2000).

En un estudio del año 2001 se describieron los efectos de la administración de GLP-1 o exendina-4 a ratas Wistar inyectadas con STZ el día de su nacimiento (modelo n0-STZ). Este modelo animal se caracteriza por una regeneración espontánea, pero incompleta, de la masa beta que empieza a los tres-cinco días después del nacimiento. Se ha hipotetizado que esta regeneración es debida a la diferenciación de células progenitoras. Los animales fueron tratados con el GLP-1 o con exendina-4 durante 5 días a partir del nacimiento. A los 7 días de vida, los animales n0-STZ tratados con GLP-1 o con exendina-4 presentaban una masa beta significativamente mayor que la de las ratas control n0-STZ no tratadas. Este aumento en la masa beta se correspondía con un aumento de la neogénesis de células β –cuantificado como el número de células beta aisladas o número de células

beta muy cercanas a los ductos-, ya que no se detectó un aumento de proliferación o disminución de la apoptosis de las células beta (Tourrel, Bailbe et al. 2001).

La rata Zucker (Zucker diabetic fatty; ZDF) es un modelo espontáneo de diabetes tipo 2 que presenta un defecto en su receptor de leptina y se caracteriza por una inadecuada masa beta debido a una apoptosis incrementada y una menor tasa de proliferación de las células beta. El tratamiento de estas ratas con GLP-1 mejoró la tolerancia a la glucosa de los animales, aumentó la proporción de células beta marcadas con Ki67, un antígeno expresado en las células en división y también disminuyó el número de células beta apoptóticas (Farilla, Hui et al. 2002).

En el 2002 Wang y Brubaker estudiaron los efectos de exendina-4 en ratones prediabéticos *db/db*. Demostraron que el tratamiento prevenía la aparición de la hiperglucemia y promovía la expansión de la masa beta con un aumento en la proliferación y una disminución de la apoptosis de las células beta (Wang and Brubaker 2002). Otro estudio de ese mismo año confirmó el aumento de masa beta y replicación en ratones *db/db* diabéticos tratados con liraglutida (Rolin, Larsen et al. 2002).

Dos estudios del año 2003 con el análogo del GLP-1 liraglutida sugirieron que los efectos de este sobre la expansión de la masa beta son dependientes del estado metabólico del animal (Bock, Pakkenberg et al. 2003; Sturis, Gotfredsen et al. 2003) ya que que el tratamiento con GLP-1 no resultó en un aumento de proliferación ni de masa celular beta cuando se administró a animales en situación de normoglucemia.

El tratamiento con GLP-1 de ratones inyectados con varias dosis bajas de estreptozotocina (low-doses STZ) -un conocido inductor de apoptosis de las células beta- reducía significativamente la apoptosis de las células beta pancreáticas, mientras que los ratones transgénicos GLP-1R $-/-$ mostraban una susceptibilidad incrementada a la apoptosis inducida por STZ (Li, Hansotia et al. 2003).

Un estudio del año 2006 por el laboratorio de Bonner-Weir volvió a remarcar el hecho de que la regeneración pancreática estimulada por exendina-4 era debida a un aumento de neogénesis de las células beta. Utilizaron ratas SD diabéticas tras una única inyección de STZ y trataron a las ratas con una dosis diaria de exendina-4 durante 10 días. Los análisis histológicos de los páncreas mostraron que no había cambios en la apoptosis de las células β , pero sí un aumento de células insulina positivas en los ductos pancreáticos, resultante en un aumento de la masa beta (Xu, Kaneto et al. 2006).

Ratones NOD diabéticos fueron tratados con GLP-1 o con una combinación de GLP-1 y gastrina durante 3 semanas. Mientras que la monoterapia con GLP-1 no fue capaz de aumentar ni la

Introducción 4 .GLP-1

masa beta ni el contenido de insulina de los animales diabéticos la combinación de ambos tratamientos resultó ser más eficaz. El tratamiento con gastrina y GLP-1 combinados aumentó el contenido de insulina y la masa beta, protegió a las células beta de la apoptosis y también permitió aumentar al número de células ductales que expresaban la insulina (Suarez-Pinzon, Power et al. 2008).

En el campo del trasplante de islotes, los trabajos con análogos del GLP-1 son un poco más tardíos y existe una gran variación en los resultados obtenidos. En el 2005 se publicó el primer estudio de trasplante de islotes y GLP-1. Se transplantaron ratones diabéticos por STZ con islotes frescos o cultivados en presencia o ausencia de exendina-4 y se les administró vehículo o exendina-4. El tratamiento de los animales receptores con exendina-4 no tenía efectos en la homeostasis de la glucosa, pero sí el cultivo, que en presencia de exendina-4 acortaba el tiempo para obtener la curación, aunque no conseguía igualar los mejores resultados obtenidos con el trasplante de islotes frescos (King, Lock et al. 2005). En el 2006, Sharma y colaboradores demostraron que el tratamiento con exendina-4 mejoraba el pronóstico a corto plazo del trasplante de islotes de rata a ratones atímicos diabéticos por STZ. Si además, los islotes se precultivaban con exendina-4, el número de animales con injerto funcional aumentaba aún más (Sharma, Sörenby et al. 2006).

Un estudio del grupo de Shapiro fue el primero en determinar parámetros de supervivencia y crecimiento de las células beta de islotes transplantados a animales diabéticos tratados con un análogo del GLP-1 (liraglutida). Siguieron a los ratones a muy largo plazo y observaron que los tratados con liraglutida revertían antes a normoglucemia y presentaban una mejor tolerancia a la glucosa. La replicación de las células beta no estaba aumentada dos semanas después del trasplante, pero la apoptosis se encontró disminuida en los injertos de los animales inyectados con liraglutida dos días después del trasplante (Merani, Truong et al. 2008). Ese mismo año otro estudio con exendina-4 coincidía en describir efectos beneficiosos del tratamiento sobre los injertos en cuanto a menor tiempo de curación y mayor masa beta del injerto (Toyoda, Okitsu et al. 2008). Sin embargo otro estudio de ese mismo año del grupo de Stoffers, con dilatada experiencia en el campo de los análogos del GLP-1 y las células beta, afirmaba que el tratamiento con exendina-4 no tiene efectos beneficiosos sobre la masa beta transplantada ya que en su estudio no detectaron ningún aumento de la replicación ni inhibición de la apoptosis, si bien los animales (ratas) tratados tenían tendencia a presentar niveles de glucemia más bajos sin ser estadísticamente significativos (Crutchlow, Yu et al. 2008).

En definitiva, en los últimos años se han hecho numerosos estudios sobre los efectos de la administración de GLP-1 o análogos sobre las células beta en diferentes modelos animales en los que

se advierte una gran diversidad de resultados probablemente debido a la variabilidad de modelos animales utilizados y de los estados metabólicos considerados.

En cuanto a la proliferación de las células beta los análogos del GLP-1 han mostrado su efectividad en ratones db/db prediabéticos (Wang and Brubaker 2002) y diabéticos (Rolin, Larsen et al. 2002), ratas Zucker diabéticas (Farilla, Hui et al. 2002) pero sin embargo no fueron capaces de aumentar la proliferación de las células beta en ratas SD pancreatectomizadas al 90% (Xu, Stoffers et al. 1999) ni en ratas Wistar n0-STZ (Tourrel, Bailbe et al. 2001) ni en ratas ZDF diabéticas (Sturis, Gotfredsen et al. 2003). En el caso del trasplante de islotes ninguno de los dos estudios que medían la replicación de las células beta encontraron diferencias en la proliferación entre los animales tratados con el análogo y los controles (Crutchlow, Yu et al. 2008; Merani, Truong et al. 2008).

Los efectos de los análogos de GLP-1 sobre neogénesis de células beta fueron evaluados en algunos de los modelos que hemos descrito; en ratas pancreatectomizadas al 95% se sugirió neogenesis debido a un aumento de masa beta no correlacionado con un aumento de proliferación (Xu, Stoffers et al. 1999), en ratas Wistar se sugirió aumento de neogenesis por aumento del numero de células insulina positivas en los ductos (Perfetti, Zhou et al. 2000) en ratas Wistar n0-STZ se detectó un aumento del numero de agrupaciones aisladas de células positivas para insulina asi como de células insulina positivas en los ductos (Tourrel, Bailbe et al. 2001) y en ratas SD diabéticas por STZ también se sugirió la neogénesis por aumento del numero de células insulina positivas en los ductos (Xu, Kaneto et al. 2006).

En cuanto a la apoptosis los análogos del GLP-1 han sido capaces de prevenir la apoptosis de células beta en ratones db/db prediabéticos (Wang and Brubaker 2002), ratones C57BL6 inyectados con múltiples dosis de STZ (Li, Hansotia et al. 2003), ratas Zucker diabéticas (Farilla, Hui et al. 2002), islotes transplantados a ratones diabéticos (Merani, Truong et al. 2008). mientras que no se consiguió prevenir la apoptosis en ratas diabéticas por STZ (Xu, Kaneto et al. 2006) ni en ratas Wistar n0-STZ (Tourrel, Bailbe et al. 2001) ni en los islotes transplantados a ratas diabéticas (Crutchlow, Yu et al. 2008).

Dada la diversidad de resultados y modelos utilizados es difícil sacar conclusiones firmes sobre los efectos de los análogos del GLP-1 sobre la regeneración y supervivencia de las células beta pancreaticas in vivo. Además otra de las limitaciones es que pocos de los estudios realizados hasta ahora contemplan los tres aspectos –proliferación, neogénesis y apoptosis- en un mismo modelo animal.

5. Referencias Bibliográficas

- Abrahamsen, N., K. Lundgren, et al. (1995). "Regulation of glucagon receptor mRNA in cultured primary rat hepatocytes by glucose and cAMP." J Biol Chem **270**(26): 15853-15857.
- Agersø, H., L. B. Jensen, et al. (2002). "The pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of NN2211, a new long-acting GLP-1 derivative, in healthy men." Diabetologia **45**(2): 195-202.
- Aguayo-Mazzucato, C., A. Koh, et al. (2010). "Mafa expression enhances glucose-responsive insulin secretion in neonatal rat beta cells." Diabetologia.
- Alonso, L., T. Yokoe, et al. (2007). "Glucose infusion in mice: a new model to induce beta-cell replication." Diabetes **56**(7): 1792-1801.
- Apelqvist, A., H. Li, et al. (1999). "Notch signalling controls pancreatic cell differentiation." Nature **400**(6747): 877-881.
- Arnette, D., T. Gibson, et al. (2003). "Regulation of ERK1 and ERK2 by glucose and peptide hormones in pancreatic beta cells." J Biol Chem **278**(35): 32517-32525.
- Astrup, A., S. Rössner, et al. (2009). "Effects of liraglutide in the treatment of obesity: a randomised, double-blind, placebo-controlled study." Lancet **374**(9701): 1606-1616.
- Baggio, L., J. Kim, et al. (2004). "Chronic exposure to GLP-1R agonists promotes homologous GLP-1 receptor desensitization in vitro but does not attenuate GLP-1R-dependent glucose homeostasis in vivo." Diabetes **53 Suppl 3**: S205-214.
- Baggio, L. L. and D. J. Drucker (2006). "Therapeutic approaches to preserve islet mass in type 2 diabetes." Annu.Rev.Med. **57**: 265-281.
- Ballian, N. and F. Brunicardi (2007). "Islet vasculature as a regulator of endocrine pancreas function." World J Surg **31**(4): 705-714.
- Ballinger, W. and P. Lacy (1972). "Transplantation of intact pancreatic islets in rats." Surgery **72**(2): 175-186.
- Ban, K., M. Noyan-Ashraf, et al. (2008). "Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways." Circulation **117**(18): 2340-2350.
- Baudino, T., C. McKay, et al. (2002). "c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression." Genes Dev **16**(19): 2530-2543.

Introducción:5. Referencias Bibliográficas

- Bergsten, P. (1995). "Slow and fast oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ in pancreatic islets correspond to pulsatile insulin release." Am J Physiol **268**(2 Pt 1): E282-287.
- Bernal-Mizrachi, E., W. Wen, et al. (2001). "Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia." J Clin Invest **108**(11): 1631-1638.
- Bertelli, E. and M. Bendayan (1997). "Intermediate endocrine-acinar pancreatic cells in duct ligation conditions." Am J Physiol **273**(5 Pt 1): C1641-1649.
- Biarnes, M., M. Montolio, et al. (2002). "Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia." Diabetes **51**(1): 66-72.
- Billestrup, N. and J. Nielsen (1991). "The stimulatory effect of growth hormone, prolactin, and placental lactogen on beta-cell proliferation is not mediated by insulin-like growth factor-I." Endocrinology **129**(2): 883-888.
- Blonde, L., E. Klein, et al. (2006). "Interim analysis of the effects of exenatide treatment on A1C, weight and cardiovascular risk factors over 82 weeks in 314 overweight patients with type 2 diabetes." Diabetes Obes Metab **8**(4): 436-447.
- Bock, T., B. Pakkenberg, et al. (2003). "The endocrine pancreas in non-diabetic rats after short-term and long-term treatment with the long-acting GLP-1 derivative NN2211." APMIS **111**(12): 1117-1124.
- Bonner-Weir, S., L. Baxter, et al. (1993). "A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development." Diabetes **42**(12): 1715-1720.
- Bonner-Weir, S. and A. Sharma (2002). "Pancreatic stem cells." J Pathol **197**(4): 519-526.
- Bonner-Weir, S., E. Toschi, et al. (2004). "The pancreatic ductal epithelium serves as a potential pool of progenitor cells." Pediatr Diabetes **5 Suppl 2**: 16-22.
- Bonner-Weir, S. and G. C. Weir (2005). "New sources of pancreatic beta-cells." Nat. Biotechnol. **23**(7): 857-861.
- Bullock, B., R. Heller, et al. (1996). "Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor." Endocrinology **137**(7): 2968-2978.
- Buteau, J., W. El Assaad, et al. (2004). "Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipototoxicity." Diabetologia **47**(5): 806-815.
- Buteau, J., S. Foisy, et al. (2003). "Glucagon-like peptide-1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor." Diabetes **52**(1): 124-132.

Introducción:5. Referencias Bibliográficas

- Buteau, J., S. Foisy, et al. (2001). "Protein kinase Czeta activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic beta-cell proliferation." Diabetes **50**(10): 2237-2243.
- Buteau, J., R. Roduit, et al. (1999). "Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells." Diabetologia **42**(7): 856-864.
- Buteau, J., M. L. Spatz, et al. (2006). "Transcription factor FoxO1 mediates glucagon-like peptide-1 effects on pancreatic beta-cell mass." Diabetes **55**(5): 1190-1196.
- Butler, A., R. Galasso, et al. (2010). "Pancreatic duct replication is increased with obesity and type 2 diabetes in humans." Diabetologia **53**(1): 21-26.
- Butler, A., J. Janson, et al. (2003). "Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes." Diabetes **52**(1): 102-110.
- Campos, R., Y. Lee, et al. (1994). "Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse." Endocrinology **134**(5): 2156-2164.
- CITR, m. (2009). "2007 update on allogeneic islet transplantation from the Collaborative Islet Transplant Registry (CITR)." Cell Transplant **18**(7): 753-767.
- Cozar-Castellano, I., N. Fiaschi-Taesch, et al. (2006). "Molecular control of cell cycle progression in the pancreatic beta-cell." Endocr Rev **27**(4): 356-370.
- Creutzfeldt, W., N. Kleine, et al. (1996). "Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients." Diabetes Care **19**(6): 580-586.
- Crutchlow, M., M. Yu, et al. (2008). "Exendin-4 does not promote Beta-cell proliferation or survival during the early post-islet transplant period in mice." Transplant Proc **40**(5): 1650-1657.
- Davalli, A., L. Scaglia, et al. (1996). "Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period. Dynamic changes in structure and function." Diabetes **45**(9): 1161-1167.
- de Heer, J., C. Rasmussen, et al. (2008). "Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, inhibits glucagon secretion via somatostatin (receptor subtype 2) in the perfused rat pancreas." Diabetologia **51**(12): 2263-2270.
- De León, D., S. Deng, et al. (2003). "Role of endogenous glucagon-like peptide-1 in islet regeneration after partial pancreatectomy." Diabetes **52**(2): 365-371.
- Deacon, C. (2004). "Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1." Diabetes **53**(9): 2181-2189.

Introducción:5. Referencias Bibliográficas

- Dean, P. (1973). "Ultrastructural morphometry of the pancreatic β -cell." Diabetologia **9**(2): 115-119.
- Delmeire, D., D. Flamez, et al. (2003). "Type VIII adenylyl cyclase in rat beta cells: coincidence signal detector/generator for glucose and GLP-1." Diabetologia **46**(10): 1383-1393.
- Devendra, D., E. Liu, et al. (2004). "Type 1 diabetes: recent developments." BMJ **328**(7442): 750-754.
- Dhanvantari, S., A. Izzo, et al. (2001). "Coregulation of glucagon-like peptide-1 synthesis with proglucagon and prohormone convertase 1 gene expression in enteroendocrine GLUTag cells." Endocrinology **142**(1): 37-42.
- Diamond, A. and R. Gill (2000). "An essential contribution by IFN-gamma to CD8+ T cell-mediated rejection of pancreatic islet allografts." J Immunol **165**(1): 247-255.
- Dickson, L. and C. Rhodes (2004). "Pancreatic beta-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 **287**(2): E192-198.
- Ding, W., E. Renström, et al. (1997). "Glucagon-like peptide I and glucose-dependent insulinotropic polypeptide stimulate Ca²⁺-induced secretion in rat alpha-cells by a protein kinase A-mediated mechanism." Diabetes **46**(5): 792-800.
- Dor, Y., J. Brown, et al. (2004). "Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation." Nature **429**(6987): 41-46.
- Dor, Y. and D. Melton (2008). "Facultative endocrine progenitor cells in the adult pancreas." Cell **132**(2): 183-184.
- Doyle, M. E. and J. M. Egan (2007). "Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas." Pharmacol.Ther. **113**(3): 546-593.
- Drucker, D. (2006). "The biology of incretin hormones." Cell Metab **3**(3): 153-165.
- Drucker, D. J., J. Philippe, et al. (1987). "Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **84**(10): 3434-3438.
- Dunlop, M., E. Muggli, et al. (1996). "Association of cyclin-dependent kinase-4 and cyclin D1 in neonatal beta cells after mitogenic stimulation by lysophosphatidic acid." Biochem Biophys Res Commun **218**(1): 132-136.
- Dvorak, H., L. Brown, et al. (1995). "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis." Am J Pathol **146**(5): 1029-1039.
- Dyachok, O., Y. Isakov, et al. (2006). "Oscillations of cyclic AMP in hormone-stimulated insulin-secreting beta-cells." Nature **439**(7074): 349-352.

Introducción:5. Referencias Bibliográficas

- Easom, R. (1999). "CaM kinase II: a protein kinase with extraordinary talents germane to insulin exocytosis." Diabetes **48**(4): 675-684.
- Elbrønd, B., G. Jakobsen, et al. (2002). "Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and tolerability of a single-dose of NN2211, a long-acting glucagon-like peptide 1 derivative, in healthy male subjects." Diabetes Care **25**(8): 1398-1404.
- Eng, J., W. A. Kleinman, et al. (1992). "Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas." J.Biol.Chem. **267**(11): 7402-7405.
- Erdogdu, O., D. Nathanson, et al. (2010). "Exendin-4 stimulates proliferation of human coronary artery endothelial cells through eNOS-, PKA- and PI3K/Akt-dependent pathways and requires GLP-1 receptor." Mol Cell Endocrinol **325**(1-2): 26-35.
- Estil les, E., N. Téllez, et al. (2009). "High sensitivity of beta-cell replication to the inhibitory effects of interleukin-1beta: modulation by adenoviral overexpression of IGF2 in rat islets." J Endocrinol **203**(1): 55-63.
- Eto, K., Y. Tsubamoto, et al. (1999). "Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion." Science **283**(5404): 981-985.
- Farilla, L., H. Hui, et al. (2002). "Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats." Endocrinology **143**(11): 4397-4408.
- Fehmann, H. and J. Habener (1992). "Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-I(7-37) stimulation of proinsulin gene expression and proinsulin biosynthesis in insulinoma beta TC-1 cells." Endocrinology **130**(1): 159-166.
- Fehmann, H., J. Jiang, et al. (1994). "Ligand-specificity of the rat GLP-I receptor recombinantly expressed in Chinese hamster ovary (CHO-) cells." Z Gastroenterol **32**(4): 203-207.
- Finegood, D., G. Weir, et al. (1999). "Prior streptozotocin treatment does not inhibit pancreas regeneration after 90% pancreatectomy in rats." Am J Physiol **276**(5 Pt 1): E822-827.
- Flint, A., A. Raben, et al. (1998). "Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans." J Clin Invest **101**(3): 515-520.
- Friedrichsen, B., E. Galsgaard, et al. (2001). "Growth hormone- and prolactin-induced proliferation of insulinoma cells, INS-1, depends on activation of STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5)." Mol Endocrinol **15**(1): 136-148.

Introducción:5. Referencias Bibliográficas

- Friedrichsen, B. N., N. Neubauer, et al. (2006). "Stimulation of pancreatic beta-cell replication by incretins involves transcriptional induction of cyclin D1 via multiple signalling pathways." J.Endocrinol. **188**(3): 481-492.
- Gangaram-Panday, S., M. Faas, et al. (2007). "Towards stem-cell therapy in the endocrine pancreas." Trends Mol Med **13**(4): 164-173.
- Gao, Z., R. Young, et al. (2002). "Protein kinase A translocation and insulin secretion in pancreatic beta-cells: studies with adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis." Biochem J **368**(Pt 2): 397-404.
- Gianani, R. and G. Eisenbarth (2005). "The stages of type 1A diabetes: 2005." Immunol Rev **204**: 232-249.
- Giddings, S., J. Chirgwin, et al. (1982). "Effects of glucose on proinsulin messenger RNA in rats in vivo." Diabetes **31**(7): 624-629.
- Gomez, E., C. Pritchard, et al. (2002). "cAMP-dependent protein kinase and Ca²⁺ influx through L-type voltage-gated calcium channels mediate Raf-independent activation of extracellular regulated kinase in response to glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells." J Biol Chem **277**(50): 48146-48151.
- Grant, S., G. Thorleifsson, et al. (2006). "Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes." Nat Genet **38**(3): 320-323.
- Grieve, D., R. Cassidy, et al. (2009). "Emerging cardiovascular actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1: potential therapeutic benefits beyond glycaemic control?" Br J Pharmacol **157**(8): 1340-1351.
- Gu, G., J. Dubauskaite, et al. (2002). "Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors." Development **129**(10): 2447-2457.
- Halban, P., M. German, et al. (2010). "Current status of islet cell replacement and regeneration therapy." J Clin Endocrinol Metab **95**(3): 1034-1043.
- Hay, C., E. Sinclair, et al. (2005). "Glucagon-like peptide-1 stimulates human insulin promoter activity in part through cAMP-responsive elements that lie upstream and downstream of the transcription start site." J Endocrinol **186**(2): 353-365.
- Heller, R., T. Kieffer, et al. (1997). "Insulinotropic glucagon-like peptide I receptor expression in glucagon-producing alpha-cells of the rat endocrine pancreas." Diabetes **46**(5): 785-791.
- Heller, R. S. and G. W. Aponte (1995). "Intra-islet regulation of hormone secretion by glucagon-like peptide-1-(7--36) amide." Am.J.Physiol **269**(6 Pt 1): G852-G860.
- Hill, D., J. Petrik, et al. (1998). "Growth factors and the regulation of fetal growth." Diabetes Care **21 Suppl 2**: B60-69.

Introducción:5. Referencias Bibliográficas

- Holst, J. J. (2007). "The physiology of glucagon-like peptide 1." Physiol Rev. **87**(4): 1409-1439.
- Holz, G. t., W. Kühnreiter, et al. (1993). "Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37)." Nature **361**(6410): 362-365.
- Hui, H., C. Wright, et al. (2001). "Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells." Diabetes **50**(4): 785-796.
- Huotari, M., J. Palgi, et al. (1998). "Growth factor-mediated proliferation and differentiation of insulin-producing INS-1 and RINm5F cells: identification of betacellulin as a novel beta-cell mitogen." Endocrinology **139**(4): 1494-1499.
- Hügl, S., M. White, et al. (1998). "Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells." J Biol Chem **273**(28): 17771-17779.
- Inada, A., C. Nienaber, et al. (2008). "Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(50): 19915-19919.
- Jahn, R. and T. Südhof (1999). "Membrane fusion and exocytosis." Annu Rev Biochem **68**: 863-911.
- Jahr, H., B. Hering, et al. (1995). "Isolated human pancreatic islets in vitro activate human complement." Transplant Proc **27**(6): 3270.
- Jahr, H., G. Pfeiffer, et al. (1999). "Endotoxin-mediated activation of cytokine production in human PBMCs by collagenase and Ficoll." J Mol Med **77**(1): 118-120.
- Jansson, L. and P. Carlsson (2002). "Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets." Diabetologia **45**(6): 749-763.
- Jansson, L. and S. Sandler (1989). "Pancreatic and islet blood flow in the regenerating pancreas after a partial pancreatectomy in adult rats." Surgery **106**(5): 861-866.
- Jetton, T., B. Everill, et al. (2008). "Enhanced beta-cell mass without increased proliferation following chronic mild glucose infusion." Am J Physiol Endocrinol Metab **294**(4): E679-687.
- Jhala, U. S., G. Canettieri, et al. (2003). "cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2." Genes Dev. **17**(13): 1575-1580.
- Johansson, M., A. Andersson, et al. (2006). "Perinatal development of the pancreatic islet microvasculature in rats." J Anat **208**(2): 191-196.

Introducción:5. Referencias Bibliográficas

- Johansson, M., L. Jansson, et al. (2007). "Improved vascular engraftment and function of autotransplanted pancreatic islets as a result of partial pancreatectomy in the mouse and rat." Diabetologia **50**(6): 1257-1266.
- Jun, H. (2010). "In vivo regeneration of insulin-producing beta-cells." Adv Exp Med Biol **654**: 627-640.
- Kang, G., O. Chepurny, et al. (2005). "A cAMP and Ca²⁺ coincidence detector in support of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in mouse pancreatic beta cells." J Physiol **566**(Pt 1): 173-188.
- Kashima, Y., T. Miki, et al. (2001). "Critical role of cAMP-GEFII--Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion." J Biol Chem **276**(49): 46046-46053.
- Kelly, R. (1990). "Microtubules, membrane traffic, and cell organization." Cell **61**(1): 5-7.
- King, A., J. Lock, et al. (2005). "Islet transplantation outcomes in mice are better with fresh islets and exendin-4 treatment." Diabetologia **48**(10): 2074-2079.
- Knoch, K., R. Meisterfeld, et al. (2006). "cAMP-dependent phosphorylation of PTB1 promotes the expression of insulin secretory granule proteins in beta cells." Cell Metab **3**(2): 123-134.
- Kreymann, B., G. Williams, et al. (1987). "Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man." Lancet **2**(8571): 1300-1304.
- Kwon, G., C. Marshall, et al. (2004). "Signaling elements involved in the metabolic regulation of mTOR by nutrients, incretins, and growth factors in islets." Diabetes **53** Suppl 3: S225-232.
- Kwon, G., K. L. Pappan, et al. (2004). "cAMP Dose-dependently prevents palmitate-induced apoptosis by both protein kinase A- and cAMP-guanine nucleotide exchange factor-dependent pathways in beta-cells." J.Biol.Chem. **279**(10): 8938-8945.
- Lammert, E., G. Gu, et al. (2003). "Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets." Curr Biol **13**(12): 1070-1074.
- Lardon, J., N. Huyens, et al. (2004). "Exocrine cell transdifferentiation in dexamethasone-treated rat pancreas." Virchows Arch **444**(1): 61-65.
- Larsen, P., C. Fledelius, et al. (2001). "Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivative NN2211 induces lasting and reversible weight loss in both normal and obese rats." Diabetes **50**(11): 2530-2539.
- Lawlor, M. and D. Alessi (2001). "PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses?" J Cell Sci **114**(Pt 16): 2903-2910.

Introducción:5. Referencias Bibliográficas

- Lawrence, M., H. Bhatt, et al. (2002). "NFAT regulates insulin gene promoter activity in response to synergistic pathways induced by glucose and glucagon-like peptide-1." Diabetes **51**(3): 691-698.
- Laybutt, D., M. Glandt, et al. (2003). "Critical reduction in beta-cell mass results in two distinct outcomes over time. Adaptation with impaired glucose tolerance or decompensated diabetes." J Biol Chem **278**(5): 2997-3005.
- Leahy, J. L., S. Bonner-Weir, et al. (1988). "Minimal chronic hyperglycemia is a critical determinant of impaired insulin secretion after an incomplete pancreatectomy." J.Clin.Invest **81**(5): 1407-1414.
- Lee, Y. and J. Nielsen (2009). "Regulation of beta cell replication." Mol Cell Endocrinol **297**(1-2): 18-27.
- Li, L., W. El Kholy, et al. (2005). "Glucagon-like peptide-1 protects beta cells from cytokine-induced apoptosis and necrosis: role of protein kinase B." Diabetologia **48**(7): 1339-1349.
- Li, Y., X. Cao, et al. (2005). "beta-Cell Pdx1 expression is essential for the gluco regulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1." Diabetes **54**(2): 482-491.
- Li, Y., T. Hansotia, et al. (2003). "Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis." J.Biol.Chem. **278**(1): 471-478.
- Lifson, N., K. Kramlinger, et al. (1980). "Blood flow to the rabbit pancreas with special reference to the islets of Langerhans." Gastroenterology **79**(3): 466-473.
- MacDonald, P., X. Wang, et al. (2003). "Antagonism of rat beta-cell voltage-dependent K⁺ currents by exendin 4 requires dual activation of the cAMP/protein kinase A and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways." J Biol Chem **278**(52): 52446-52453.
- Maechler, P., S. Carobbio, et al. (2006). "In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion." Int J Biochem Cell Biol **38**(5-6): 696-709.
- Matschinsky, F. (1996). "Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm." Diabetes **45**(2): 223-241.
- Melloul, D., S. Marshak, et al. (2002). "Regulation of insulin gene transcription." Diabetologia **45**(3): 309-326.
- Menger, M., J. Yamauchi, et al. (2001). "Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans." World J Surg **25**(4): 509-515.
- Merani, S., W. Truong, et al. (2008). "Liraglutide, a long-acting human glucagon-like peptide 1 analog, improves glucose homeostasis in marginal mass islet transplantation in mice." Endocrinology **149**(9): 4322-4328.

Introducción:5. Referencias Bibliográficas

- Miki, T., K. Nagashima, et al. (1999). "The structure and function of the ATP-sensitive K⁺ channel in insulin-secreting pancreatic beta-cells." J Mol Endocrinol **22**(2): 113-123.
- Moens, K., H. Heimberg, et al. (1996). "Expression and functional activity of glucagon, glucagon-like peptide I, and glucose-dependent insulinotropic peptide receptors in rat pancreatic islet cells." Diabetes **45**(2): 257-261.
- Montanya, E. (2001). "El trasplante de islotes de páncreas como terapia en la diabetes tipo 1." Endocrinología y Nutrición **48**(8): 223-225.
- Montanya, E. (2004). "Islet- and stem-cell-based tissue engineering in diabetes." Curr Opin Biotechnol **15**(5): 435-440.
- Montolio, M., M. Biarnes, et al. (2007). "Interleukin-1beta and inducible form of nitric oxide synthase expression in early syngeneic islet transplantation." J.Endocrinol. **192**(1): 169-177.
- Montolio, M., N. Tellez, et al. (2005). "Short-term culture with the caspase inhibitor z-VAD.fmk reduces beta cell apoptosis in transplanted islets and improves the metabolic outcome of the graft." Cell Transplant. **14**(1): 59-65.
- Montolio, M., N. Téllez, et al. (2007). "Role of blood glucose in cytokine gene expression in early syngeneic islet transplantation." Cell Transplant **16**(5): 517-525.
- Montrose-Rafizadeh, C., P. Avdonin, et al. (1999). "Pancreatic glucagon-like peptide-1 receptor couples to multiple G proteins and activates mitogen-activated protein kinase pathways in Chinese hamster ovary cells." Endocrinology **140**(3): 1132-1140.
- Montrose-Rafizadeh, C., Y. Wang, et al. (1997). "Overexpression of glucagon-like peptide-1 receptor in an insulin-secreting cell line enhances glucose responsiveness." Mol Cell Endocrinol **130**(1-2): 109-117.
- Naftanel, M. and D. Harlan (2004). "Pancreatic islet transplantation." PLoS Med **1**(3): e58; quiz e75.
- Newgard, C. and J. McGarry (1995). "Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction." Annu Rev Biochem **64**: 689-719.
- Nielsen, D., M. Welsh, et al. (1985). "Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. I. Effects of glucose and cyclic AMP on the transcription of insulin mRNA." J Biol Chem **260**(25): 13585-13589.
- Oberg-Welsh, C., S. Sandler, et al. (1997). "Effects of vascular endothelial growth factor on pancreatic duct cell replication and the insulin production of fetal islet-like cell clusters in vitro." Mol Cell Endocrinol **126**(2): 125-132.

Introducción:5. Referencias Bibliográficas

- Olsson, R. and P. Carlsson (2006). "The pancreatic islet endothelial cell: emerging roles in islet function and disease." Int J Biochem Cell Biol **38**(5-6): 710-714.
- Onengut-Gumuscu, S. and P. Concannon (2005). "The genetics of type 1 diabetes: lessons learned and future challenges." J Autoimmun **25 Suppl**: 34-39.
- Orci, L. (1982). "Macro- and micro-domains in the endocrine pancreas." Diabetes **31**(6 Pt 1): 538-565.
- Orskov, C., J. Holst, et al. (1988). "Effect of truncated glucagon-like peptide-1 [proglucagon-(78-107) amide] on endocrine secretion from pig pancreas, antrum, and nonantral stomach." Endocrinology **123**(4): 2009-2013.
- Orskov, C., J. Holst, et al. (1987). "Pancreatic and intestinal processing of proglucagon in man." Diabetologia **30**(11): 874-881.
- Orskov, C. and S. S. Poulsen (1991). "Glucagonlike peptide-I-(7-36)-amide receptors only in islets of Langerhans. Autoradiographic survey of extracerebral tissues in rats." Diabetes **40**(10): 1292-1296.
- Otonkoski, T., G. Beattie, et al. (1994). "Hepatocyte growth factor/scatter factor has insulinotropic activity in human fetal pancreatic cells." Diabetes **43**(7): 947-953.
- Otonkoski, T., V. Cirulli, et al. (1996). "A role for hepatocyte growth factor/scatter factor in fetal mesenchyme-induced pancreatic beta-cell growth." Endocrinology **137**(7): 3131-3139.
- Park, S., X. Dong, et al. (2006). "Exendin-4 uses Irs2 signaling to mediate pancreatic beta cell growth and function." J Biol Chem **281**(2): 1159-1168.
- Parsons, J., A. Bartke, et al. (1995). "Number and size of islets of Langerhans in pregnant, human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: effect of lactogenic hormones." Endocrinology **136**(5): 2013-2021.
- Parsons, J., T. Brelje, et al. (1992). "Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion." Endocrinology **130**(3): 1459-1466.
- Pearson, K., D. Scott, et al. (1977). "Effects of partial surgical pancreatectomy in rats. I. Pancreatic regeneration." Gastroenterology **72**(3): 469-473.
- Perfetti, R. and H. Hui (2004). "The role of GLP-1 in the life and death of pancreatic beta cells." Horm.Metab Res. **36**(11-12): 804-810.

Introducción:5. Referencias Bibliográficas

- Perfetti, R., J. Zhou, et al. (2000). "Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats." Endocrinology **141**(12): 4600-4605.
- Plachot, C., J. Movassat, et al. (2001). "Impaired beta-cell regeneration after partial pancreatectomy in the adult Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of type II diabetes." Histochem Cell Biol **116**(2): 131-139.
- Prentki, M. and C. Nolan (2006). "Islet beta cell failure in type 2 diabetes." J Clin Invest **116**(7): 1802-1812.
- Rafiq, I., H. Kennedy, et al. (1998). "Glucose-dependent translocation of insulin promoter factor-1 (IPF-1) between the nuclear periphery and the nucleoplasm of single MIN6 beta-cells." J Biol Chem **273**(36): 23241-23247.
- Rahier, J., Y. Guiot, et al. (2008). "Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes." Diabetes Obes Metab **10 Suppl 4**: 32-42.
- Ranta, F., D. Avram, et al. (2006). "Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells, an effect reversed by exendin-4." Diabetes **55**(5): 1380-1390.
- Rao, A., C. Luo, et al. (1997). "Transcription factors of the NFAT family: regulation and function." Annu Rev Immunol **15**: 707-747.
- Ren, J., P. Jin, et al. (2007). "Pancreatic islet cell therapy for type I diabetes: understanding the effects of glucose stimulation on islets in order to produce better islets for transplantation." J Transl Med **5**: 1.
- Rhodes, C. (2000). "Introduction: the molecular cell biology of insulin production." Semin Cell Dev Biol **11**(4): 223-225.
- Rhodes, C. and C. Alarcón (1994). "What beta-cell defect could lead to hyperproinsulinemia in NIDDM? Some clues from recent advances made in understanding the proinsulin-processing mechanism." Diabetes **43**(4): 511-517.
- Richter, G., O. Feddersen, et al. (1993). "GLP-1 stimulates secretion of macromolecules from airways and relaxes pulmonary artery." Am J Physiol **265**(4 Pt 1): L374-381.
- Ricordi, C., A. Tzakis, et al. (1992). "Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases." Transplantation **53**(2): 407-414.
- Rodríguez-Mulero, S. and E. Montanya (2008). "Islet graft response to transplantation injury includes upregulation of protective as well as apoptotic genes." Cell Transplant **17**(9): 1025-1034.
- Rolin, B., M. O. Larsen, et al. (2002). "The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases beta-cell mass in diabetic mice." Am.J.Physiol Endocrinol.Metab **283**(4): E745-E752.

Introducción:5. Referencias Bibliográficas

- Rutter, G., P. Burnett, et al. (1996). "Subcellular imaging of intramitochondrial Ca²⁺ with recombinant targeted aequorin: significance for the regulation of pyruvate dehydrogenase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(11): 5489-5494.
- Ryan, E., J. Lakey, et al. (2002). "Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control." Diabetes **51**(7): 2148-2157.
- Ryan, E., B. Paty, et al. (2005). "Five-year follow-up after clinical islet transplantation." Diabetes **54**(7): 2060-2069.
- Scaglia, L., F. Smith, et al. (1995). "Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas." Endocrinology **136**(12): 5461-5468.
- Scharp, D., P. Lacy, et al. (1991). "Intraportal islet allografts: the use of a stimulation index to represent functional results." Transplant Proc **23**(1 Pt 1): 796-798.
- Scrocchi, L. A., T. J. Brown, et al. (1996). "Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene." Nat.Med. **2**(11): 1254-1258.
- Serup, P., O. Madsen, et al. (2001). "Islet and stem cell transplantation for treating diabetes." BMJ **322**(7277): 29-32.
- Shapiro, A., J. Lakey, et al. (2000). "Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen." N Engl J Med **343**(4): 230-238.
- Shapiro, A., C. Ricordi, et al. (2006). "International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation." N Engl J Med **355**(13): 1318-1330.
- Sharma, A., A. Sörenby, et al. (2006). "Exendin-4 treatment improves metabolic control after rat islet transplantation to athymic mice with streptozotocin-induced diabetes." Diabetologia **49**(6): 1247-1253.
- Sjöholm, A. and C. Hellerström (1991). "TGF-beta stimulates insulin secretion and blocks mitogenic response of pancreatic beta-cells to glucose." Am J Physiol **260**(5 Pt 1): C1046-1051.
- Sjöholm, A., N. Welsh, et al. (1990). "Role of polyamines in mitogenic and secretory responses of pancreatic beta-cells to growth factors." Am J Physiol **259**(5 Pt 1): C828-833.
- Soares, M., D. Ishii, et al. (1985). "Developmental and tissue-specific expression of a family of transcripts related to rat insulin-like growth factor II mRNA." Nucleic Acids Res **13**(4): 1119-1134.
- Solar, M., C. Cardalda, et al. (2009). "Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth." Dev Cell **17**(6): 849-860.

Introducción:5. Referencias Bibliográficas

- Steiner, D., S. Chan, et al. (1985). "Structure and evolution of the insulin gene." Annu Rev Genet **19**: 463-484.
- Stevens, R., J. Ansite, et al. (1996). "Nitric oxide mediates early dysfunction of rat and mouse islets after transplantation." Transplantation **61**(12): 1740-1749.
- Stoffers, D., T. Kieffer, et al. (2000). "Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas." Diabetes **49**(5): 741-748.
- Stoffers, D. A. (2004). "The development of beta-cell mass: recent progress and potential role of GLP-1." Horm.Metab Res. **36**(11-12): 811-821.
- Sturis, J., C. F. Gotfredsen, et al. (2003). "GLP-1 derivative liraglutide in rats with beta-cell deficiencies: influence of metabolic state on beta-cell mass dynamics." Br.J.Pharmacol. **140**(1): 123-132.
- Suarez-Pinzon, W., J. Lakey, et al. (2008). "Combination therapy with glucagon-like peptide-1 and gastrin induces beta-cell neogenesis from pancreatic duct cells in human islets transplanted in immunodeficient diabetic mice." Cell Transplant **17**(6): 631-640.
- Suarez-Pinzon, W., R. Power, et al. (2008). "Combination therapy with glucagon-like peptide-1 and gastrin restores normoglycemia in diabetic NOD mice." Diabetes **57**(12): 3281-3288.
- Sutherland, D., R. Gruessner, et al. (2004). "Beta-cell replacement therapy (pancreas and islet transplantation) for treatment of diabetes mellitus: an integrated approach." Transplant Proc **36**(6): 1697-1699.
- Suzuki, A., H. Nakauchi, et al. (2004). "Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting." Diabetes **53**(8): 2143-2152.
- Swenne, I. (1982). "The role of glucose in the in vitro regulation of cell cycle kinetics and proliferation of fetal pancreatic B-cells." Diabetes **31**(9): 754-760.
- Südhof, T. (1995). "The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions." Nature **375**(6533): 645-653.
- Taylor, S., J. Buechler, et al. (1990). "cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes." Annu Rev Biochem **59**: 971-1005.
- Tellez, N., M. Montolio, et al. (2007). "Adenoviral overproduction of interleukin-1 receptor antagonist increases beta cell replication and mass in syngeneically transplanted islets, and improves metabolic outcome." Diabetologia **50**(3): 602-611.
- Teuscher, A., D. Kendall, et al. (1998). "Successful islet autotransplantation in humans: functional insulin secretory reserve as an estimate of surviving islet cell mass." Diabetes **47**(3): 324-330.

Introducción:5. Referencias Bibliográficas

- Thorens, B. (1992). "Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(18): 8641-8645.
- Todd, J. (2010). "Etiology of type 1 diabetes." Immunity **32**(4): 457-467.
- Torshave, D., P. Kristensen, et al. (2008). "Expression of the GLP-1 receptor in mouse, rat, and human pancreas." J Histochem Cytochem **56**(9): 841-851.
- Tourrel, C., D. Bailbe, et al. (2001). "Glucagon-like peptide-1 and exendin-4 stimulate beta-cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age." Diabetes **50**(7): 1562-1570.
- Toyoda, K., T. Okitsu, et al. (2008). "GLP-1 receptor signaling protects pancreatic beta cells in intraportal islet transplant by inhibiting apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **367**(4): 793-798.
- Trümper, J., D. Ross, et al. (2005). "The Rap-B-Raf signalling pathway is activated by glucose and glucagon-like peptide-1 in human islet cells." Diabetologia **48**(8): 1534-1540.
- Trümper, K., A. Trümper, et al. (2000). "Integrative mitogenic role of protein kinase B/Akt in beta-cells." Ann N Y Acad Sci **921**: 242-250.
- Tsuboi, T., G. da Silva Xavier, et al. (2003). "Glucagon-like peptide-1 mobilizes intracellular Ca²⁺ and stimulates mitochondrial ATP synthesis in pancreatic MIN6 beta-cells." Biochem J **369**(Pt 2): 287-299.
- Tuttle, R., N. Gill, et al. (2001). "Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha." Nat Med **7**(10): 1133-1137.
- Vantyghem, M., J. Kerr-Conte, et al. (2009). "Primary graft function, metabolic control, and graft survival after islet transplantation." Diabetes Care **32**(8): 1473-1478.
- Vargas, F., M. Vives-Pi, et al. (1998). "Endotoxin contamination may be responsible for the unexplained failure of human pancreatic islet transplantation." Transplantation **65**(5): 722-727.
- Verdich, C., A. Flint, et al. (2001). "A meta-analysis of the effect of glucagon-like peptide-1 (7-36) amide on ad libitum energy intake in humans." J Clin Endocrinol Metab **86**(9): 4382-4389.
- Wang, H., T. Brun, et al. (2007). "MAFA controls genes implicated in insulin biosynthesis and secretion." Diabetologia **50**(2): 348-358.
- Wang, Q. and P. L. Brubaker (2002). "Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice." Diabetologia **45**(9): 1263-1273.

Introducción:5. Referencias Bibliográficas

- Wang, Q., L. Li, et al. (2004). "Glucagon-like peptide-1 regulates proliferation and apoptosis via activation of protein kinase B in pancreatic INS-1 beta cells." *Diabetologia* **47**(3): 478-487.
- Wang, R. N., G. Kloppel, et al. (1995). "Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats." *Diabetologia* **38**(12): 1405-1411.
- Wang, X., C. Cahill, et al. (1999). "Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, PDX-1, in insulinoma cells." *Endocrinology* **140**(10): 4904-4907.
- Wang, X., J. Zhou, et al. (2001). "Glucagon-like peptide-1 causes pancreatic duodenal homeobox-1 protein translocation from the cytoplasm to the nucleus of pancreatic beta-cells by a cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A-dependent mechanism." *Endocrinology* **142**(5): 1820-1827.
- Wang, Y., J. Egan, et al. (1995). "Glucagon-like peptide-1 affects gene transcription and messenger ribonucleic acid stability of components of the insulin secretory system in RIN 1046-38 cells." *Endocrinology* **136**(11): 4910-4917.
- Warnock, G., N. Kneteman, et al. (1992). "Long-term follow-up after transplantation of insulin-producing pancreatic islets into patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus." *Diabetologia* **35**(1): 89-95.
- Weber, T., B. Zemelman, et al. (1998). "SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion." *Cell* **92**(6): 759-772.
- White, M. (2002). "IRS proteins and the common path to diabetes." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **283**(3): E413-422.
- White, S., M. Nicholson, et al. (2000). "Can islet cell transplantation treat diabetes?" *BMJ* **321**(7262): 651-652.
- Wiederkehr, A. and C. Wollheim (2006). "Minireview: implication of mitochondria in insulin secretion and action." *Endocrinology* **147**(6): 2643-2649.
- Xu, G., H. Kaneto, et al. (2007). "Downregulation of GLP-1 and GIP Receptor Expression by Hyperglycemia: Possible Contribution to Impaired Incretin Effects in Diabetes." *Diabetes*.
- Xu, G., H. Kaneto, et al. (2006). "GLP-1/exendin-4 facilitates beta-cell neogenesis in rat and human pancreatic ducts." *Diabetes Res Clin Pract*.
- Xu, G., D. A. Stoffers, et al. (1999). "Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats." *Diabetes* **48**(12): 2270-2276.
- Xu, X., J. D'Hoker, et al. (2008). "Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas." *Cell* **132**(2): 197-207.

Introducción:5. Referencias Bibliográficas

- Yew, K., M. Hembree, et al. (2005). "Cross-talk between bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta signaling is essential for exendin-4-induced insulin-positive differentiation of AR42J cells." J Biol Chem **280**(37): 32209-32217.
- Yew, K. H., K. L. Prasad, et al. (2004). "Interplay of glucagon-like peptide-1 and transforming growth factor-beta signaling in insulin-positive differentiation of AR42J cells." Diabetes **53**(11): 2824-2835.
- Yu, M., C. Moreno, et al. (2003). "Antihypertensive effect of glucagon-like peptide 1 in Dahl salt-sensitive rats." J Hypertens **21**(6): 1125-1135.
- Zhou, J., M. A. Pineyro, et al. (2002). "Exendin-4 differentiation of a human pancreatic duct cell line into endocrine cells: involvement of PDX-1 and HNF3beta transcription factors." J.Cell Physiol **192**(3): 304-314.
- Zhou, J., X. Wang, et al. (1999). "Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells." Diabetes **48**(12): 2358-2366.

