



**FACULTAD DE FARMACIA**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO:**

**ESTRATEGIAS ACTUALES Y  
PERSPECTIVAS FUTURAS EN LA TERAPIA DE  
LA DIABETES TIPO 2**

Autor: Daniel de Juan Robles

D.N.I.: 50895490D

Tutor: Oscar Escribano Illanes

Convocatoria: Febrero

## **Resumen:**

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad que cursa con un aumento de la glucemia que está asociada a una resistencia a la respuesta de la insulina en los órganos diana pudiendo producir daños en arterias periféricas, accidente cerebrovascular, nefropatía o retinopatía. El tratamiento actual de la DM2 comienza con un cambio en el estilo de vida (ejercicio y dieta) y fármacos que incrementan la liberación de insulina o fármacos que mejoran la actuación de ésta en los órganos diana. Las perspectivas del tratamiento en un futuro están aún siendo estudiadas, entre ellas se encuentra el tratamiento de la DM2 a través de células madre que sustituirán el páncreas ya que éste está dañado por la resistencia a la insulina en un estado avanzado de la enfermedad. Otra perspectiva de futuro es el tratamiento de la DM2 a través de los llamados miRNAs, fragmentos pequeños de RNA transcritos de la parte del DNA llamada no codificante que son capaces de regular multitud de procesos del organismo.

## **Introducción:**

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico asociado a un incremento en la glucemia. Según la OMS la DM afecta a 347 millones de personas en todo el mundo y predice que en el 2030 esta cifra se multiplique por dos.

Existen dos tipos fundamentales de D: La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) donde hay una ausencia de insulina en sangre por la falta de producción de ésta en las células  $\beta$  del páncreas y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) en la que hay una resistencia a la insulina por parte de los tejidos.

Una hiperglucemia persistente tanto en DM1 o DM2 produce daños tanto macrovasculares (enfermedades coronarias, enfermedades de arterias periféricas y/o una enfermedad cerebrovascular) como microvasculares (nefropatía diabética y/o retinopatía)

El aumento de la glucemia estimula la secreción de insulina en las células  $\beta$  del páncreas. La glucosa entra en las células  $\beta$  a través de GLUT-2, en el interior de la célula se metaboliza la glucosa mediante en ciclo de Krebs aumentando el ratio ATP/ADP. El aumento ATP dentro de la célula produce un bloqueo del canal de potasio dependiente de ATP por lo que se produce una despolarización de la membrana,

abriendo así los canales de Ca voltaje dependiente. El incremento de Ca intracelular conlleva la unión de las vesículas que contienen insulina a la membrana y la consiguiente exocitosis.

La DM2 representa alrededor del 90% de la diabetes. Se puede decir que la etiología de la diabetes recae en dos pilares fundamentales: estilo de vida y genética.

1. Estilo de vida: los factores de riesgo relacionados con la DM2 son la obesidad ( $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$ ), sobrepeso ( $IMC > 25 \text{ kg/m}^2$ ), estrés, dieta no equilibrada, sedentarismo y urbanización. Un exceso de grasa corporal aumenta a un 60-80% el riesgo de padecer DM2.
2. Genética: hay multitud de genes relacionados con la aparición de DM2, siendo perspectiva de un futuro tratamiento el gen TCF7L2.

La progresión de la prediabetes a DM2 es la siguiente:

1. Antes de su inicio los tejidos (adipocitos, miocitos y hepatocitos) comienzan una resistencia a la insulina lo que genera en el páncreas una secreción mayor de insulina, que conlleva a una hipertrofia pancreática que es capaz de regular la glucemia. En el hígado al no entrar la glucosa a los hepatocitos, comienza una gluconeogénesis y lipólisis (un aumento de ácidos grasos libres en sangre favorece la resistencia a la insulina).
2. Justo en el inicio de la diabetes, a la hipertrofia pancreática le sigue la destrucción progresiva de los islotes pancreáticos (mecanismos desconocidos) y una disminución en la secreción de insulina. Ésta destrucción es irreversible. En este preciso momento es cuando se suele diagnosticar la DM2. En el momento del diagnóstico la cantidad de masa pancreática destruida es alrededor del 50%.

En este trabajo trataremos de explicar las estrategias actuales y perspectivas futuras en el tratamiento de la DM2.

## **Material y métodos:**

Se realizó una revisión sistemática de artículos científicos y revisiones realizadas sobre este tema. La principal herramienta utilizada es pubmed, con ayuda de páginas web certificadas. Han sido leídos numerosos *review's* de los que se sacó la información necesaria para la realización de este otro *review*.

## **Resultados:**

### **1. Tratamiento actual de la DM2**

- Inhibidores de la alfa-glucosidasa

Las enzimas alfa-glucosidasas son un grupo de enzimas que se encuentran en las vellosidades del tubo digestivo, produciendo el desdoblamiento de oligosacáridos (maltosa, sacarosa y otros oligosacáridos) en monosacáridos (glucosa, fructosa y galactosa). Estas enzimas son maltasas, sacarosas, glucoamilasas y dextrinasas).

El Miglitol y la Acarbosa son dos de los inhibidores de la glucosidasa más utilizados. Son pseudocarbohidratos que realizan una inhibición competitiva de la enzima. La Acarbosa es el cabeza de grupo y se trata de un pseudotetrasacárido con un nitrógeno unido entre la primera y la segunda molécula de glucosa. La Acarbosa es obtenida a través de la fermentación llevada a cabo por *Actinoplanes utahensis*. Este nitrógeno entre la 1ª y 2ª molécula de glucosa es el responsable de su gran afinidad por el centro activo de la enzima y su estabilidad. También produce una inhibición sobre la  $\alpha$ -amilasa pero sin efecto sobre la  $\beta$ -glucosidasa (como la lactasa). La acarbosa es absorbida en pequeñas cantidades excretándose en casi su totalidad por las heces. Sin embargo el miglitol es absorbido en su totalidad y excretado sin metabolizarse por la orina. Al producir una inhibición de enzimas intestinales y ser local, estos medicamentos se administran junto con las comidas (con el primer bocado) y tres veces al día con una dosis que tiene un mínimo de 25mg hasta los 100mg (Acarbosa).

Este tipo de antidiabético oral se usa de primera línea en una DM2 recientemente diagnosticada y cuando ésta no se corrige con un estilo de vida saludable (dieta y ejercicio) ya que evita la liberación de monosacáridos absorbibles de los polisacáridos no absorbibles provenientes de los alimentos. La mayor parte de esta inhibición se

realiza en la parte proximal del intestino, produciéndose la absorción de monosacáridos en la parte distal de éste, siempre en menor cantidad. Este tratamiento puede ir en combinación con otros antidiabéticos orales (sulfonilureas, metformina) o incluso insulina cuando en monoterapia no se consigue una mejora en los niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c) o niveles de glucosa posprandial.

Estos fármacos están contraindicados en personas con hipersensibilidad a estas moléculas, pacientes con cetoacidosis diabética, alguna enfermedad inflamatoria intestinal, obstrucción o alteración en la absorción de nutrientes.

Los inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa producen como se ha comentado anteriormente que los oligosacáridos no se degraden a monosacáridos por lo que éstos llegan al colon donde las bacterias los metabolizan produciendo un aumento de gases y posibles diarreas. Se consideran estas dos consecuencias como efectos adversos. (1)

- Biguanidas:

La metformina es el antihiper glucemiante más usado para el tratamiento de la DM2. El principio activo proviene de la planta *Galega officinalis* que fue descubierto a finales de 1800. Se observó que esta planta era rica en guanidinas y que éstas tenían un poder hipoglucemiante. Debido a la alta toxicidad de las guanidinas, se desarrollaron moléculas menos tóxicas consistentes en dos guanidinas unidas por el nitrógeno. La metformina no fue utilizada hasta el 1957 debido al comienzo del tratamiento de la diabetes con insulina.

El tratamiento con biguanidas, en general, presenta ventajas frente a la insulina, ya que no producen una hipoglucemia por no provocar ni exocitosis de insulina ni aumento de su síntesis. Los antecesores de la metformina (fenformina y buformina) provocaron en clínica casos de acidosis láctica, cosa que la metformina no presentaba, teniendo así un perfil de seguridad superior y siendo establecido por la OMS como medicamento de primera línea en el tratamiento de la DM2.

En los últimos años, se ha descrito en la literatura médica el uso de metformina en otras enfermedades tales como el cáncer y enfermedades cardiovasculares (ECV).

La diana biológica de la metformina son los hepatocitos, adipocitos y miocitos, y debido a su naturaleza hidrofóbica su transporte al interior de estas células es llevado a cabo



- Inhibidores de la DPP-4

Cuando ingerimos alimentos, el íleon secreta al torrente sanguíneo una hormona llamada glucagon-like peptide 1 (GLP-1) que favorece a su vez la secreción de insulina por parte de las células  $\beta$  pancreáticas.

La acción de GLP-1 se produce a varios niveles:

- Páncreas: aumenta síntesis de insulina, disminuye síntesis de glucagón, aumenta proliferación de células  $\beta$  y disminuye apoptosis de éstas (frenando el deterioro del páncreas)
- Cerebro: disminuye apetito y aumenta saciedad
- Músculo: aumenta la entrada de glucosa y su almacenamiento
- Hígado: disminuye la gluconeogénesis
- Adipocitos: aumenta lipogénesis
- Estómago: enlentece el vaciado gástrico

El efecto de GLP-1 en pacientes con DM2 está reducido o es incluso nulo, lo cual favorece la progresión de la diabetes. Algunos autores consideran que el responsable de la secreción del 60% de insulina es la GLP-1 ; debido a esto se contempló GLP-1 como una posible terapia para la DM2.

Respecto a los análogos de GLP-1 no se consideran buenos fármacos por su rápida metabolización ( $t_{1/2}=2$  minutos) por la enzima dipeptidilpeptidasa-4 (DPP-4). Por este motivo son utilizados en la práctica los inhibidores de DPP-4.

Esta peptidasa se encuentra en numerosos tejidos tales como intestino, hígado, bazo, pulmón, cerebro, corazón, endotelio vascular, páncreas, útero, timo y en mayor proporción en el riñón. En muchos casos la GLP-1 es degradada antes de abandonar el intestino a través de las DPP-4 enterocíticas.

Los primeros inhibidores de DPP-4 fueron sitagliptina, vildagliptina y más recientemente saxagliptina, alogliptina y linagliptina.

En un primer estudio de la sitagliptina se pudo observar que administrando diariamente este inhibidor se conseguía una inhibición del 70-90% de la enzima durante 24h, tiempo suficiente para la protección completa de la incretina y su correcta acción en los diferentes tejidos.

Estos fármacos se pueden dividir en dos grandes grupos: peptidomiméticos (Vildagliptina) y no peptidomiméticos (Sitagliptina, alogliptina y linagliptina), siendo los de la segunda familia los más seguros ya que tienen una gran afinidad sobre DPP-4 y no sobre peptidasas de la misma familia como DPP-2,8 y 9, reduciendo así posibles efectos adversos derivados del aumento de determinados péptidos.

TABLE 3: Main characteristics of the DPP-4 inhibitors already approved for use in the US and/or EU market: sitagliptin, vildagliptin, saxagliptin, alogliptin, and linagliptin.

	Sitagliptin	Vildagliptin	Saxagliptin	Alogliptin	Linagliptin
Dosing	100 mg qd	50 mg bid	5 mg qd	25 mg qd	5 mg qd
Max. DPP-4 inhibition (%)	±97	±95	70–80	>90	>90
Selectivity for DPP-4	High	High	Moderate	High	High
<sup>†</sup> HbA1c reduction (%)	0.5–1.0	0.9 (mean value)	0.5–1.0	0.6 (mean value)	0.5–0.7
Hypoglycaemic risk	Low	Low	Low	Low	Low
Half-life compound ( $t_{1/2}$ , h)	±12	1.5–3	±2.5	11–22	>100
Bioavailability (%)	±87	±85	±67	—	±30
Metabolism/elimination	Renal excretion almost unchanged (70–80% parent)	Renal excretion (±26% parent and ±55% as metabolite obtained after hydrolysis)	Liver metabolized to active metabolite by P450 3A4/5 and renal excretion (12–29% unchanged parent and 21–52% as metabolite)	Renal excretion almost unchanged parent (60–70%)	Biliary excretion almost unchanged (>70% unchanged parent) and renal (<6%)

Como se puede observar, el fármaco de primera elección dentro de los inhibidores de DPP-4 sería la Sitagliptina debido a su alto grado de inhibición de la enzima, su especificidad sobre ésta, su reducción de HbA1c, su bajo riesgo de hipoglucemia, su alta  $t_{1/2}$  y su alta biodisponibilidad.

Actualmente las guías médicas aconsejan el uso de este fármaco junto a otros antidiabéticos, sobre todo en pacientes que tengan un aumento en la incidencia de hipoglucemias. La perspectiva futura de este tratamiento en pacientes que han sido diagnosticados precozmente o que son prediabéticos es el tratamiento con este tipo de antidiabéticos ya que aún conservan una buena funcionalidad de sus células  $\beta$  y la buena respuesta de éstas a la GLP-1, idea que aún está en estudio. Por otra parte, viendo los beneficios en la reducción de los niveles de glucagón, los inhibidores de DPP-4 podrían ser utilizados en pacientes con una DM2 avanzada en combinación con otros antidiabéticos orales. (4)

- Análogos de GLP-1

Como he comentado en los inhibidores de la DPP-4, la incretina GLP-1 es liberada por las células L del íleon y colon inhibiendo la apoptosis de las células  $\beta$  y mejorando su función, mejorando la sensibilidad a la insulina y la entrada de glucosa en células del tejido adiposo y muscular. Además tiene efectos extrapancreáticos en órganos como el aparato digestivo, aparato locomotor e incluso el sistema nervioso.

El cabeza de familia de los análogos de GLP-1 está la Exenatida, el cual mejora la secreción de insulina postprandial, promueve una pérdida de peso con ausencia de efectos hipoglucémicos. La Exenatida se aisló de una hormona del monstruo de gila (*Heloderma suspectum*) llamada exendin-4 y que es un mimético de la incretina humana (GLP-1).

Al igual que la metformina, los análogos de GLP-1 son capaces de disminuir tanto la gluconeogénesis hepática como los niveles de glucosa en ayuno y postprandial, con la diferencia que estos análogos son capaces de mejorar la sensibilidad a la insulina y su resistencia en tejidos periféricos.

Otros antidiabéticos orales que han sido comparados con la Exenatida fueron las tiazolidindionas y las sulfonilureas. Las tiazolidindionas tienen el inconveniente de incrementar apetito, lipogénesis, aumento de peso y frecuentemente agravan problemas cardíacos. Por otra parte, las sulfonilureas producen un aumento de peso, episodios de hipoglucemia, aceleran la apoptosis de las células  $\beta$  y dañan el endotelio.

Se ha demostrado que los análogos de GLP-1 han logrado una mejor respuesta en la reducción de hemoglobina glicosilada (HbA1c) en comparación con insulina, sitagliptina y metformina.

En la actualidad, los análogos de GLP-1 se usan en dosis semanales subcutáneas de liberación sostenida. La tecnología es la microencapsulación de la molécula de Exenatida con una cubierta de ácido láctico-glicólico, la cual es degradada mediante una hidrólisis no enzimática.

Los posibles efectos adversos en el tratamiento con Exenatida suelen darse a nivel del tracto gastrointestinal (nauseas, vomitos, diarreas que suelen aparecer en los primeros días de tratamiento), también aumento del ritmo cardíaco y aumento de presión arterial. Estudios realizados tras su comercialización han asociado el tratamiento con Exenatida con pancreatitis hemorrágica o necrotizante de leve a grave. (5)

- Sulfonilureas

Las sulfonilureas (SU) se utilizan en el tratamiento de la DM2 debido a que en 1942, Janbon et al. descubrió que algunas sulfonamidas que se estaban estudiando como posibles antibióticos generaban una hipoglucemia en animales tratados con éstas. Desde este hallazgo se diseñaron moléculas como puede ser la Carbutamida que fue la primera SU utilizada como antidiabético oral pero retirada del mercado por sus efectos adversos en la médula ósea. El principal efecto de éstas es el incremento de insulina en el torrente sanguíneo pero sólo cuando hay un remanente de células  $\beta$  pancreáticas. Este incremento se debe a una estimulación de las células  $\beta$  y a una disminución del aclaramiento hepático de insulina. El incremento en la cantidad de insulina en el torrente sanguíneo y la respuesta a ésta en los órganos diana (hepatocitos, adipocitos y miocitos) es mucho mayor en el primer mes de tratamiento que en meses consecutivos por motivos que trataremos más adelante.

El mecanismo de acción que lleva a una estimulación de las células  $\beta$  es el siguiente: las SU se unen específicamente al receptor de SU de las células  $\beta$ , bloqueando el canal ATP-dependiente e impidiendo el flujo de K al interior de las células produciendo una despolarización de la membrana y abriendo así el canal de Ca. El aumento de Ca en el citosol es el responsable de la exocitosis de la insulina en grandes cantidades.

Es muy importante recalcar que la liberación de insulina que producen las SU es totalmente independiente de los niveles de glucosa sanguíneos, pudiendo producir hipoglucemia si no se ajusta bien la dosis. Se ha observado que un tratamiento crónico con SU produce una disminución de la secreción de insulina debido a una disminución de los receptores de SU en las células  $\beta$ , efecto que se corrige con la interrupción del tratamiento. También se ha observado que las SU ejercen otros efectos como puede ser la mejor utilización de la glucosa en tejidos periféricos mediante dos mecanismos: estimulación de la gluconeogénesis hepática y aumento del número y sensibilidad de receptores de insulina.

Las SU se clasifican de acuerdo a su vida media ( $t_{1/2}$ ):

Vida corta: Glibenclamida, tolbutamida, glipizida, gliquidona y gliciclamida.

Vida media: Acetohexamida y glibormurida

Vida larga: Cloropropamida

Estos hipoglucemiantes son utilizados en la práctica debido a un bajo coste, posibilidad de utilizarla en una única toma diaria y la posibilidad de su asociación con metformina. Sin embargo, nuevos estudios demuestran la posibilidad de la combinación de SU (con una alta velocidad en la restauración de la glucemia) con antidiabéticos tales como glitazonas, inhibidores DPP-4, análogos GLP-1 o incluso insulina de larga duración cuando la combinación con metformina falla. (6)(7)

- Inhibidores de Co-transportadores sodio-glucosa tipo 2 renal

Los riñones en situación normal contribuyen al mantenimiento de la glucemia mediante la reabsorción de casi toda la glucosa que ha sido filtrada en las nefronas. Esta reabsorción es llevada a cabo por los co-transportadores sodio-glucosa tipo 2 (SGLT-2) ubicados en el túbulo proximal de la nefrona.

El umbral de la concentración de glucosa en plasma a partir del cual se produce la excreción de glucosa vía renal (glucosuria) y la reabsorción por SGLT-2 están aumentados en DM2 lo cual produce un aumento en la expresión de este tipo de transportador en el túbulo proximal que conlleva a un mayor riesgo de hiperglucemia.; es por esta razón que los inhibidores de estos transportadores son una nueva elección en el tratamiento de la DM2 junto con otros antidiabéticos orales.

Uno de los beneficios que poseen los inhibidores de SGLT-2 es la pérdida de peso en pacientes con sobrepeso u obesos y la no ganancia en normopeso (factor de riesgo de DM2). Los inhibidores de SGLT-2 también producen una reducción de la presión sanguínea por la ya comentada pérdida de peso y por un efecto diurético. También producen un aumento de HDL-colesterol pero con un ligero aumento de LDL-colesterol lo cual deberá ser controlado y tratado por el médico. Así mismo, se observó en los ensayos clínicos un aumento de los episodios de infecciones urinarias de leves a moderadas pudiendo ser tratadas con tratamientos estándar.

Los principales inhibidores de SGLT-2 son Canagliflocina, Dapagliflocina y Empagliflocina los cuales son bien tolerados vía oral y su frecuencia de hipoglucemia fue menor que otros antidiabéticos orales excepto si éstos eran administrados junto con insulina. Están contraindicados en personas con una función renal alterada (GFR<45mL/min para canagliflocina y empagliflocina y GFR<60 mL/min para dapagliflocina). (8)(9)

- Tiazolidindionas

Las tiazolidindionas (TZD) son fármacos que mejoran la sensibilidad a la insulina de sus receptores aumentando así la disponibilidad de glucosa por los tejidos diana, reduciendo la gluconeogénesis hepática y disminuyendo la hemoglobina glicosilada (HbA1c). Esta actividad ha sido demostrada tanto en pacientes con DM2 como en pacientes con obesidad (factor de riesgo para padecer DM2).

El mecanismo de acción de las TZD transcurre a través de PPAR- $\lambda$ , receptor nuclear ligando-inducible. La unión de la TZD con PPAR- $\lambda$  produce que este receptor se una a cofactores que promueven el desacoplamiento de PPAR- $\lambda$  de la región del promotor y la posterior transcripción de genes que intervienen en la cascada de señalización de transportadores de glucosa (GLUT-4) y sustrato de receptores de insulina (IRS) de tejido adiposo y del músculo esquelético. Cuando actúan las TZD sobre su diana (PPAR- $\lambda$ ) se produce un aumento en la expresión de IRS-1 y IRS-2, sustratos de la actividad tirosina kinasa de los dominios intracelulares del receptor de insulina (RI). IRS-1 y 2 fosforilados activan una cascada de señalización que termina con el aumento de afinidad de los transportadores GLUT-4 por la membrana celular, aumentando así la entrada de glucosa en las células del tejido adiposo y muscular, disminuyendo la glucemia.

Según su mecanismo de acción, podemos decir que las TZD son fármacos que aumentan la sensibilidad a la insulina derivada de la DM2 y que promueven una disminución de la resistencia a la insulina ya que la activación de PPAR- $\lambda$  también induce el control de la secreción de determinadas moléculas por parte del tejido adiposo como son adipocinas, TNF- $\alpha$ , leptina, resistina, 11  $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y adiponectina que favorecerían la resistencia a la insulina. También se ve mejorada la presión sanguínea por la supresión del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) y estabilización de aterosclerosis inhibiendo SRAA, tromboxano A2 y disminuyendo los niveles séricos de LDL-colesterol oxidada (principal factor de riesgo en aterosclerosis y enfermedad cardiovascular).

Las principales TZD son: Pioglitazona, Rosiglitazona y Troglitazona. Demostrada la eficacia en cuanto a su acción antidiabética y como protector de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular, deberán tenerse en cuenta las posibles reacciones adversas de las TZD en el momento de su utilización en la práctica clínica. Estos efectos adversos

comprenden: hipoglucemia, ganancia de peso, fallo cardíaco, edema, riesgo de enfermedad cardiovascular y fallo hepático. (10)

## **2. Perspectivas en el tratamiento de la DM2**

- Células madre pluripotentes

La idea de una regeneración tanto de un tejido como un órgano no es nueva, viene de la mitología, pero no fue hasta el siglo XVII cuando se observó la extraña pero a la vez curiosa regeneración de una cola de lagarto que había sido amputada. De aquí surgió un deseo creciente de vivir más tiempo, reparar tejidos dañados o simplemente vivir eternamente.

Sin embargo, la aplicación que se le da hoy en día a la biología regenerativa es el reemplazamiento celular de tejidos dañados por determinadas enfermedades. Un claro ejemplo es la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) en la cual las células  $\beta$  del páncreas son destruidas por un desgaste producido por la resistencia a la insulina. Un reemplazo de los islotes  $\beta$  pancreáticos y un cambio en el estilo de vida podría llegar a la curación de esta enfermedad. En un primer momento se pensó que este reemplazo se podría llevar a cabo a través de islotes de células  $\beta$  de cadáveres, pero ésta fuente de células es limitada. En la actualidad hay prometedoras líneas de investigación que trabajan con células madre:

- Diferenciación directa de células madre pluripotentes
- Reprogramación y transdiferenciación de otras células  $\beta$  maduras
- Células madre pluripotentes (PSC's)
- Células madre embrionarias (ESCS's)
- Células madre pluripotentes inducidas (iPSC's)

Son posibles terapias para realizar un auto reemplazamiento seguro en el que no habría ningún tipo de rechazo.

Estudios realizados en ratones muestran el desarrollo de las células pluripotentes a lo largo del desarrollo embrionario. Las primeras células pancreáticas (aún sin diferenciar) aparecen el día 9,5 y, a partir del día 11,5 todas las células que se van a diferenciar en tejido pancreático expresan en algún momento de su desarrollo las moléculas Pdx-1, Ptf1a, Sox9, Nkx6.1 y Hnf6. La deficiencia de aquellos genes que producen estas

moléculas conlleva a la completa o parcial disfunción pancreática. Células Pdx-1+ son aún pluripotentes pero solo hasta el día 12,5, momento en el que empiezan a co-expresar Ptf1a, c-Myc y CPA junto con Pdx-1 y las células se diferencian a tejido endocrino, exocrino y conductos pancreáticos. Células Pdx-1+ que se encuentran en estrecho contacto con otras que no pertenecen al tejido pancreático (exterior del páncreas) son señalizadas por FGF produciendo un bloqueo en la diferenciación celular y un aumento en la proliferación de los progenitores pancreáticos, delimitando así el órgano.

La diferenciación de las células que conforman el tejido pancreático es llevada a cabo por la señalización Notch. Notch reprime la expresión de neurogenina 3 (Ngn3) consiguiendo una estabilización de los progenitores e impidiendo una prematura diferenciación. Se ha demostrado que la supresión de Ngn3 en ratones llevaban al desarrollo de un páncreas sin islotes y la consecuente muerte por hiperglucemia.

Conociendo la naturaleza de la diferenciación celular hacia un tejido pancreático, se ha estudiado la diferenciación de células madre pluripotentes (PSC's) para el auto reemplazamiento pancreático. Tenemos diferentes estudios de las fases:

Formación del endodermo: las PSC's son estimuladas mediante WNT y TGF- $\beta$  en ausencia de suero mientras se incuban con factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Las PSC's Pdx-1+ son estimuladas posteriormente con ácido retinoico (AR), miembros de la familia FGF e inhibidores de la proteína morfogénica ósea (BMP). Finalmente los progenitores endocrinos son estimulados por Notch y tras 18-21 días son generadas células productoras de insulina. Dichas células también producían glucagon pero no eran capaces de responder al nivel de glucosa en el medio (no funcionales).

Generación de progenitores endocrinos: para una diferenciación endocrina también es necesaria la presencia de otras vías de señalización además de Pdx1 como pueden ser Nkx6.1, Sox9 y Ptf1 para una correcta diferenciación. Aún no se sabe que vías de señalización deben ser manipuladas para una correcta diferenciación de los progenitores endocrinos hacia Ngn3+. Una de las rutas de señalización más usada para diferenciación es la de Notch, donde también incluyeron inhibidores BMP4 y TGF- $\beta$  en el cultivo celular. Inhibidores de BMP mejoraba la expresión de insulina y TGF- $\beta$  mejoraba la supervivencia celular.

Diferenciación final a células beta: la etapa final de la diferenciación celular a tejido pancreático implica la maduración de los progenitores endocrinos a células  $\beta$  capaces de secretar insulina cuando la glucemia se eleva. Un estudio realizado sobre ratones demostró que la implantación de células diferenciadas a tejido pancreático

provenientes de células madre embrionarias en ratones derivó a la maduración del órgano y su capacidad de secretar insulina glucosa-dependiente. Sin embargo en la actualidad no se conoce qué señales son las que llevan a una correcta maduración del órgano in vivo, no pudiéndose realizar este proceso in vitro. Uno de los retos que surgen de este desconocimiento es el estudio de los marcadores que fueran capaces de diferenciar las células madre in vitro. Dos de los candidatos a ser marcadores de diferenciación son MafB y Ucn3, junto con la dilucidación de los marcadores que llevan a cabo la diferenciación in vivo.

Una de las perspectivas de futuro con respecto al uso de células madre embrionarias es la generación de suficientes células  $\beta$  para realizar los estudios pertinentes y su posterior trasplante. El único problema es la poca eficiencia del proceso al pasar de una etapa de diferenciación a otra ya que la inducción a un endodermo definitivo tiene un rendimiento del 90% pero el establecimiento de progenitores endocrinos tiene un rendimiento del 20-30% (el rendimiento es mucho menor in vivo). Una de las posibles soluciones al bajo número de células  $\beta$  maduras diferenciadas in vitro es la incorporación de unas condiciones óptimas en el cultivo de ESC's que permita el crecimiento celular en cada etapa. Estudios realizados han conseguido la generación de 0.4 células de endodermo definitivo por cada célula madre embrionaria cultivada y diferenciada, un rendimiento insuficiente para el trasplante de islotes pancreáticos que necesita en torno a 10000 islotes por kilogramo de peso corporal para un correcto mantenimiento de la glucemia.

Otras de las dificultades en el estudio para la utilización de células madre diferenciadas a tejido pancreático es el poco tiempo que las células mantienen su fenotipo in vitro. Después de 2-3 días de tener las células  $\beta$  en cultivo, la mitad se pierde y el remanente tiene reducida la capacidad de secretar insulina glucosa-dependiente además de tener una menor capacidad de restaurar la glucemia una vez trasplantados los islotes pancreáticos diferenciados a ratones. Se han podido observar en estudios posteriores que la supervivencia de estas células  $\beta$  mejora cuando éstas son cultivadas en un medio de cultivo donde no sólo estén este tipo de células sino que también haya células no endocrinas y endoteliales. Esto indica que el auto reemplazamiento mejoraría con una implantación del conjunto que formarían los islotes pancreáticos y no solo de las células secretoras de insulina. (11)

- microRNAs

En las últimas dos décadas se ha descubierto que sólo un 1-2% del genoma humano codifica proteínas a través de la transcripción y traducción y que el otro 98-99% es transcrito a RNA no codificante los cuales han sido considerados como una gran maquinaria de regulación de procesos tanto fisiológicos como patológicos. Entre estos RNAs no codificantes se encuentran los miRNAs (miRNA), hebras simples de ARN no codificante con una longitud de 22 nucleótidos aproximadamente cuya función es la regulación de la expresión genética por la unión de éstos a la región UTR de los RNA mensajeros (mRNA) produciendo su desestabilización y así impidiendo la síntesis proteica. Estudios demuestran que los miRNAs son capaces de regular la producción y liberación de insulina mediante la regulación del ATP:ADP ratio, exocitosis y síntesis de insulina.

Los miRNA actúan en varios niveles:

- Alterando el ratio ATP:ADP

La proteína desacopladora tipo 2 (UCP2) se encuentra en la membrana de la mitocondria bloqueando la salida de  $H^+$  y produciendo así una reducción en los niveles de ATP que conlleva a un descenso en ATP:ADP y disminución de la secreción de insulina. UCP2 es la diana de miR-15, bloqueándola y aumentando así la secreción de insulina. miR-9 disminuye SIRT-1 que a su vez disminuía a UCP2, produciendo un descenso en la secreción de insulina. miR-29a y mi-29b reduce la funcionalidad del transportador de monocarboxilato 1 (MCT1), cuya molécula transportada es sustrato de las mitocondrias y así se reduce el ATP:ADP reduciendo así la secreción de insulina. miR124a produce una inhibición de FOXA2 que es el responsable de la activación del canal de  $K_{atp}$  dependiente y la inhibición de Rab27a responsable de la exocitosis de los gránulos de insulina en las células  $\beta$  pancreáticas.

- Controlando la exocitosis de insulina

Se ha estudiado que ciertos miRNAs ejercen un efecto negativo en la liberación de insulina, ya que estos producen la escisión del factor de transcripción (ONECUT2) del gen que codifica la Granuliptina, disminuyendo la secreción de ésta, implicada en la

movilización de los gránulos de insulina hacia la membrana celular de las células  $\beta$  pancreáticas.

miR-29 a/b/c produce una disminución de ONECUT2 por lo que empeora la liberación de insulina glucosa dependiente. miR-96 también reduce la cantidad Granuliptina independientemente de ONECUT2. miR-375 tiene una sobreexpresión en los islotes pancreáticos y supone una disminución de la liberación de insulina debida a una disminución de miotropina, no dejando funcionar adecuadamente a la actina encargada de la fusión de los granulos a la membrana celular. Contrariamente, miR-124a reduce la expresión de NOC2 y aumenta la de SNAP25, RAB3A y Sinapsina facilitando la exocitosis.

- Controlando el destino de células inmaduras

miR-375 es esencial para la formación de los islotes pancreáticos y su mantenimiento como células  $\alpha$  y  $\beta$ . Se ha demostrado en ratones que la interleucina 1b (IL1b) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) produce un aumento en las expresión de miR-21, miR-34a y miR-146. miR-21 tiene como diana PDCD4 e induce la muerte celular a través de las proteínas apoptóticas de la familia Bax. miR-146 produce una mejora en la apoptosis inducida por ácidos grasos libres.

El aumento o la disminución de miRNAs está relacionado con diferentes patologías, entre ellas la DM1 y DM2. La mayoría de estas variaciones interfieren en los genes encargados de la supervivencia de los islotes pancreáticos, exocitosis y resistencia a la insulina. La manipulación de los niveles de estos miRNAs es una de las posibles perspectivas de tratamiento de la DM1 y DM2. Vamos a citar las principales técnicas para la restauración de los niveles de miRNAs:

- Oligonucleótidos anti miRNAs

Estos oligonucleótidos (AMOs) son análogos modificados, moléculas pequeñas de RNA capaces de atravesar barreras fisiológicas. Las modificaciones suelen ser una fluoración o una O-metilación. Estos AMOs tienen como diana los miRNAs uniéndose de manera específica e inhibiendo así la unión de éste a su diana.

Se mostró que la aplicación de un AMO sin sentido contra miR-375 producía un aumento en la expresión de su diana (PDK1) y devolvía la liberación de insulina a sus

niveles normales (en células INS-1E). La inhibición de miR-103 y miR107 mejoraba la homeostasis de glucosa y la sensibilidad a la insulina en ratones. La inhibición de miR-320 restaura la sensibilidad a la insulina en tejido adiposo por el aumento de la señalización PI3K y el aumento de entrada de glucosa en la célula. La inhibición de miR-181a incrementa los niveles y la actividad de SIRT1 mejorando la sensibilidad a la insulina en hepatocitos.

- Regulación mediante transfección mediada por virus

El virus utilizado para esta técnica es el adenovirus, donde se introduce un plásmido que se quiere introducir en el genoma del individuo. Estos virus son los llamados virus adeno asociados (AAV), los cuáles no producen ninguna enfermedad en el hospedador, sólo una mínima respuesta inmune.

Ratones tratados con un plásmido para aumentar la expresión de miR-107

experimentaron un incremento en la glucosa posprandial y un empeoramiento en la tolerancia a la glucosa. Otros ratones fueron tratados con una inyección intravenosa con adenovirus transfectados con un plásmido para la sobreexpresión de miR-181a. Estos ratones tuvieron un empeoramiento en la señalización de la insulina en los hepatocitos y una disminución en la homeostasis de glucosa, mientras que una disminución en la expresión de este miRNA a través de AMOs produjo una mejora en la homeostasis.

- Compuestos químicos

Como ya hemos hablado, los miRNAs son moléculas que producen una inhibición de un gen que conlleva a una alteración en toda la cascada de señalización. Por ejemplo un aumento del miR-122 lleva a una resistencia a la insulina por parte del hígado y por otra parte los flavonoides extraídos de la planta del regaliz han mostrado una mejora en la resistencia a la insulina inducida por la obesidad. Quedó demostrado también que una dieta rica en ácido linoleico regulaban los miRNAs del tejido adiposo. Aún no está muy claro el mecanismo de estos compuestos químicos, siendo ésta una vía de futuras investigaciones. (12)(13)

## **Conclusiones**

Dentro de los tratamientos actuales de la DM2 pueden observarse dos grupos que tienen más ventajas que inconvenientes. Estos dos grupos son los inhibidores de DPP-4 y los análogos de GLP-1. Éstos tienen como finalidad la activación de los receptores de GLP-1 en órganos periféricos, produciendo un aumento de la síntesis de insulina, aumento de proliferación de islotes pancreáticos (conservación del páncreas), disminuyendo apetito, gluconeogénesis y aumentando la lipogénesis. Dentro de estos dos grupos, los análogos de la GLP-1 reducen los niveles de HbA1c, mejor que biguanidas e inhibidores de DPP-4.

Fármacos no recomendables o bajo especial control médico para el tratamiento de DM2 son:

- Tiazolidindionas: Por posible hipoglucemia, aumento de peso, fallo cardiaco y riesgo de ECV.
- Inhibidores de SGLT-2 en monoterapia por posible nefropatía e infecciones urinarias.
- Sulfonilureas: posible hipoglucemia.

## **Bibliografía**

1. Giuseppe Derosa, Pamela Maffioli. A-Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. Department of Internal Medicine and Therapeutics, University of Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia, Italy.2012
2. Aaron C. Pawlyk, Kathleen M. Giacomini, Catherine McKeon, Alan R. Shuldiner and Jose C. Florez. Metformin Pharmacogenomics: current status and future directions. Diabetes.2014
3. Rosina Pryor and Filipe Cabreiro. Review article. Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. Biochemical Journal.2015
4. Ricardo Godinho, Cristina Mega, Edite Teixeira-de-Lemos, Eugénia Carvalho, Frederico Teixeira, Rosa Fernandes, Flávio Reis. The place of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes therapeutics: A “me too” or “the special one” antidiabetic class?. Journal of diabetes research. 2015
5. Georgios S Papaetis. Incretin-based therapies in prediabetes: current evidence and future perspectives. World Journal of Diabetes. 2014

6. Daniele Sola, Luca Rossi, Gian Piero Carnevale Schianca, Pamela Maffioli, Marcello Bigliocca, Roberto Mella, Francesca Corliano, Gian Paolo Fra, Ettore Bartoli, Giuseppe Derosa. Sulfonylureas and their use in clinical practice. Archives of Medical Science. 2012
7. Bianca Hemmingsen MD PhD, Jeppe B. Schroll MD, Jorn Wetterslev PhD, Christian Gluud DMSc, Allan Vaag DMSc, David P. Sonne PhD, Lars H. Lundstrom MD PhD, Thomas Almdal MD DMSc. Sulfonylurea versus metformin monotherapy in patients with type 2 diabetes: a Cochrane systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials and trial sequential analysis. CMAJ Open. 2014
8. Eva M Vivian, PharmD, MS, BC-ADM, CDE. Sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors: a growing class of antidiabetic agents. Drugs in Context. 2014
9. Rebecca F Rosenwasser, Senan Sultan, David Sutton, Rushab Choksi, Benjamin J Epstein. SGLT-2 inhibitors and their potential in the treatment of diabetes. Dovepress.2013
10. David Della-Morte, Raffaele Palmirotta, Ashish K Rehni, Donatella Pastore, Barbara Capuani, Francesca Pacifici, Maria Laura De Marchis, Kunjan R Dave, Alfonso Bellia, Giuseppe Fogliame, Patrizia Ferroni, Giulia Donadel, Francesco Cacciatore, Pasquale Abete, Chuanhui Dong, Antonello Pileggi, Mario Roselli, Camillo Ricordi, Paolo Sbraccia, Fiorella Guadagni, Tatjana Rundek and Davide Lauro. Pharmacogenomics and pharmacogenetics of thiazolidinediones: role in diabetes and cardiovascular risk factors. Pharmacogenomics. 2014
11. Jolanta Chmielowiec and Malgorzata Borowiak. In Vitro Differentiation and Expansion of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Pancreatic Progenitors. The Review of DIABETIC STUDIES. 2013
12. Haiyong Chen, Hui-Yao Lan, Dimitrios H Roukos and William C Cho. Application of microRNAs in diabetes mellitus. Journal of Endocrinology
13. Suzanne M. Eken, Hong Jin, Ekaterina Chernogubova, and Lars Maegdefessel. Review article, Making Sense in Antisense: Therapeutic Potential of Noncoding RNAs in Diabetes-Induced Vascular Dysfunction. Hindawi Publishing Corporation. 2013