



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
CARRERA DE BIOLOGÍA

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE ANTAGONISTAS Y AGONISTAS
SINTÉTICOS DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE SOBRE LA
EXPRESIÓN GENÉTICA Y SECRECIÓN DE INSULINA DE ISLOTES
PANCREÁTICOS AISLADOS DE RATONES.**

**TESIS DE LICENCIATURA QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

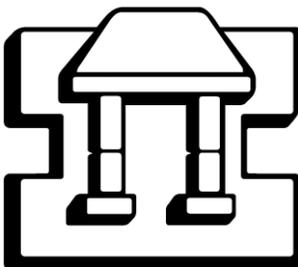
PRESENTA

TOYOKAZU UCHIDA FUENTES

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ALONSO ANTONIO VILCHES FLORES

**AVENIDA DE LOS BARRIOS #1, COL. LOS
REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO
DE MÉXICO. 2016.**



**TESIS DE LICENCIATURA APOYADA CON EL
PROYECTO PAPIIT IA203414 DGAPA-UNAM.**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS.

Esta tesis tuvo el apoyo de DGAPA-UNAM con el proyecto PAPIIT IA203414 siendo beneficiario de una beca durante 1 mes y se agradece al Dr. Rafael Villalobos Molina por facilitar las instalaciones del Laboratorio 7 de la UBIMED (FESI UNAM).

Agradecimientos y dedicatorias.

A quien me otorgo la vida, una madre, un padre, una amiga, ella quien siempre estuvo en los mejores y peores momentos de mi vida aquella con la que siempre cuento y me otorga su apoyo incondicional aunque no lo merezca, ella a la que nunca dejare de hablarle y nunca me dejare de preocupar por ella, ella quien conoce mis defectos y virtudes, ELLA mi hermosa madre María de la Paz la que hizo todo esto posible, ella la que incentivo mi intelecto solo ella es responsable de este escrito, muchas gracias madre mía, gracias, gracias, infinitamente gracias.

Al Dr. Alonso Antonio Vilches Flores quien sin su tutela y apoyo no habría podido hacer esta tesis, su paciencia fue primordial en este trabajo para poder tolerar mis ausencias, mis retardos, mi falta de conocimiento, es el quien tiene un gran mérito por aguantar tantos defectos míos por tanto tiempo, muchas gracias Prof. A los compañeros del laboratorio que hicieron más amena mi estancia en el, gracias.

A mis amigos de la carrera, que vivencias hemos tenido, aprendí tanto con ustedes tanto académicamente como personalmente, tantos recuerdos, tantos sueños, tanto pero tantos anhelos que hemos tenido, le agradezco al destino por haberlos puesto en mi camino, sin ustedes estos años de aprendizaje no hubieran sido lo mismo quizá hasta hubiera desertado en algún punto, pero es gracias a ustedes que estoy en este punto de mi vida, ustedes mi gran apoyo, es fácil olvidar aquellos días de desvelo en la casa de alguno de ustedes, es fácil olvidar esas desmadrugadas en las prácticas de campo, es fácil olvidar aquellas horas interminables en la biblioteca estudiando para un examen, pero jamás los olvidare, ustedes se quedaran en mis recuerdos y mi piel, gracias a todos por estar en los mejores y peores momentos de la carrera.

Que más puedo decir de mis queridos amigos de la prepa, ustedes que toleran mis platicas tediosas de la biología, ustedes que ya me conocían desde antes y vieron como emergía este nuevo biólogo ustedes que vieron la transición, muchas gracias por ser parte de mí, que hubiera hecho en aquellas prácticas de campo sin su conocimiento de música que me ayudo a socializar, sin sus pláticas de sus respectivas áreas con las que amenizaba con mis compañeros, sin sus sabios consejos para sobrevivencia afuera del D.F. gracias amigos. Pues termina esta etapa de mi vida y espero que ustedes sigan ahí para que vean como continua esta historia.

INDICE.

Introducción	6
1 Sistema Endocannabinoide	
1.1 Anandamina (AEA)	
1.2 Receptores para cannabinoides	
1.2.1 Receptor CB1	
1.2.2 Receptor CB2	
2 Islotes pancreáticos	
3 Diabetes mellitus (DM)	
Antecedentes	17
Hipótesis	18
Objetivos	18
General	
Particulares	
Material y métodos	19
Síntesis y purificación de rimonabant, BAR-1 y HD	
Aislamiento de islotes pancreáticos de ratón CD-1 sano	
Expresión genética	
Secreción de insulina	
Evaluaciones en el modelo de síndrome metabólico, <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>	
Estadístico de prueba	
Resultados y discusión	21
Conclusiones.	37
Referencias	38

Lista de Abreviaciones.

Endocannabinoide - EC

Sistema Endocannabinoide – SEC

Receptor cannabinoide 1 – CB1

Receptor cannabinoide 2 – CB2

Anandamina – AEA

2 araquidonilglicerol – 2-AG

N araquidonil fosfatidiletalonamina fosfalipasa D - NAPE-PLD

Diacilglicerol lipasa – DAGL

Amida hidrolasa de ácidos grasos - FAAH

Monoacilglicerol lipasa – MAGL

Diabetes Mellitus tipo 2 – DMT2

N araquidonil fosfatidiletalonamina – NAPE

Delta 9 Tetrahidrocannabinol - Δ 9 THC

Receptores acomodados a proteínas G - GPCR

Resumen

El sistema endocannabinoide es un complejo de señalización lipídica que comprende a los receptores cannabinoides CB1 y CB2, sus ligandos endocannabinoides y las enzimas necesarias para su síntesis y degradación. El SEC está compuesto de los lípidos N-araquidoniletanolamida, también denominado como Anandamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG), sintetizados por las enzimas N-araquidonil fosfatidiletalonaamina fosfolipasa D (NAPE-PLD) y Diacil-glicerol lipasa (DAGL) respectivamente; degradados por las enzimas intracelulares amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y Monoacilglicerol lipasa (MAGL), respectivamente. La Diabetes Mellitus es un grupo de alteraciones metabólicas, caracterizado por la hiperglicemia crónica resultante de la insuficiente secreción de insulina, en su acción inadecuada o ambos. La DMT2 es la primera causa de muerte en México, y por lo tanto, un serio problema de salud pública. Actualmente se cuentan con varias opciones terapéuticas para controlar el desarrollo de la diabetes, tales como el cambio en el estilo de vida con dieta y ejercicio, el tratamiento farmacológico con hipoglucemiantes, e incluso el trasplante de islotes pancreáticos. Aun así, continúa la investigación sobre nuevas alternativas terapéuticas que ayuden a mejorar la calidad de vida del paciente diabético. A mediados de la década pasada, el antagonista del receptor CB1 denominado rimonabant (SR141716A) fue propuesto como tratamiento para el sobrepeso y la obesidad, en pacientes con síndrome metabólico y DMT2, observándose una reducción significativa del apetito, de la lipogénesis y un mejoramiento metabólico. Existen evidencias sobre los efectos farmacológicos del rimonabant sobre la secreción de insulina, sin embargo, son pocos los estudios que lo demuestran directamente sobre el tejido pancreático endocrino. El BAR-1 fue sintetizado por el Dr Gabriel Navarrete y fue utilizado en ratones cepa CD-1 por tratamientos de 4 y 8 semanas en grupos Control, Dieta y BAR-1 para observar los efectos *in vivo* y para la parte *in vitro* se realizaron experimentos de expresión genética en islotes pancreáticos extraídos de ratones sanos. El incremento de peso de los ratones no tuvo ninguna diferencia significativa en el tratamiento de 4 semanas, en el tratamiento de 8 semanas se observó un aumento en el peso del grupo BAR-1 con respecto al control en la última semana. En las curvas de tolerancia a la insulina en ambos tratamientos (4 y 8 semanas) se observó una posible resistencia a la insulina debido a la dieta alta en carbohidratos y lípidos. Los niveles de triglicéridos en sangre se observaron aumentados en los grupos que tenían dieta alta de carbohidratos y lípidos pero no hubo diferencia entre los grupos tratados con BAR-1. La dieta alta en carbohidratos y lípidos aumenta la expresión de mRNA de las preprohormonas y los elementos del SEC. El tratamiento con BAR-1 sugiere un efecto que contrarresta los cambios en la expresión a las 4 semanas. En el tratamiento de 8 semanas se ve una disminución de la expresión de todos los genes ya sea dieta con o sin BAR-1. La secreción de insulina se observó sin cambios en los niveles basales en los tratamientos sin embargo en cuanto se estimulaba con glucosa los islotes del grupo BAR-1 no responden a este estímulo de la forma óptima disminuyendo la secreción de insulina.

Introducción

1. Sistema Endocannabonoide (SEC)

El sistema endocannabinoide es un complejo de señalización lipídica que comprende a los receptores cannabinoides CB1 y CB2, sus ligandos endocannabinoides y las enzimas necesarias para su síntesis y degradación (Hillard, 2000). A partir de que se describió el receptor de cannabinoides tipo 1 (CB1), una gran cantidad de estudios *in vivo* e *in vitro* han aportado evidencias sobre la función del SEC en la neuro-modulación y otros procesos fisiológicos.

El SEC está compuesto de los lípidos N-araquidoniletanolamida, también denominado como Anandamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG), sintetizados por las enzimas N-araquidonil fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD) y Diacil-glicerol lipasa (DAGL) respectivamente; degradados por las enzimas intracelulares amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y Monoacilglicerol lipasa (MAGL), respectivamente. La activación de los dos receptores de cannabinoides denominados CB1 y CB2, está ligada con la producción de AMPc y la actividad de canales iónicos. (Netzahualcoyotzi-Piedra *et al.* 2009). Los EC modulan procesos fisiológicos tales como la transmisión sináptica, la neuroprotección, la función inmune, la ingesta de alimentos y el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Bermúdez *et al.*, 2009). Existen evidencias que demuestran que el SEC aumenta su actividad en personas con obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (Matías *et al.*, 2007).

1.1 Anandamida (AEA)

La AEA es un derivado del ácido araquidónico que se sintetiza en dos pasos enzimáticos realizados en la membrana (Fig 1); en el primero de ellos, se realiza la activación de la N-acetiltransferasa, una enzima dependiente de AMPc que se encarga de catalizar la transferencia del ácido araquidónico de la fosfatidilcolina al grupo fosfato de la fosfatidiletanolamida, formando de esta manera la N-araquidonil-fosfatiletanolamida (NAPE) que, posteriormente, se hidroliza por acción de una fosfolipasa tipo D (PLD) y forma AEA. Una vez sintetizada se libera al medio extracelular (aunque aún no se sabe si esta liberación es dependiente de Ca^{2+} o si se realiza por difusión simple) y ejerce su acción uniéndose al receptor CB1. El complejo AEA-CB1 es internalizado en la terminal

por acción de una proteína transportadora de endocannabinoides; una vez internalizado se hidroliza por la FAAH formando ácido araquidónico y etanolamida, los cuales pueden volver a formar parte de los fosfolípidos de membrana. La AEA se sintetiza y se libera por neuronas GABAérgicas o glutamatérgicas, se une y activa a receptores específicos de membrana y, una vez terminada su acción, se inactiva por recaptación y la posterior degradación enzimática (Hillard, 2000). Sin embargo, la AEA no puede ser considerada como neurotransmisor debido a que no se almacena en el interior de vesículas secretoras ni se libera de la presinapsis, sino que es el precursor denominado NAPE el que sirve como depósito de almacenaje y, debido a ello, las concentraciones de AEA en el cerebro son bajas, aproximadamente 17 pmol/g de tejido. Debido a la síntesis postsináptica de este EC y a la localización presináptica del receptor CB1, se propone que la función del SEC pudiera controlar el proceso de neurotransmisión en determinadas neuronas del cerebro (Netzahualcoyotzi-Piedra *et al.* 2009).

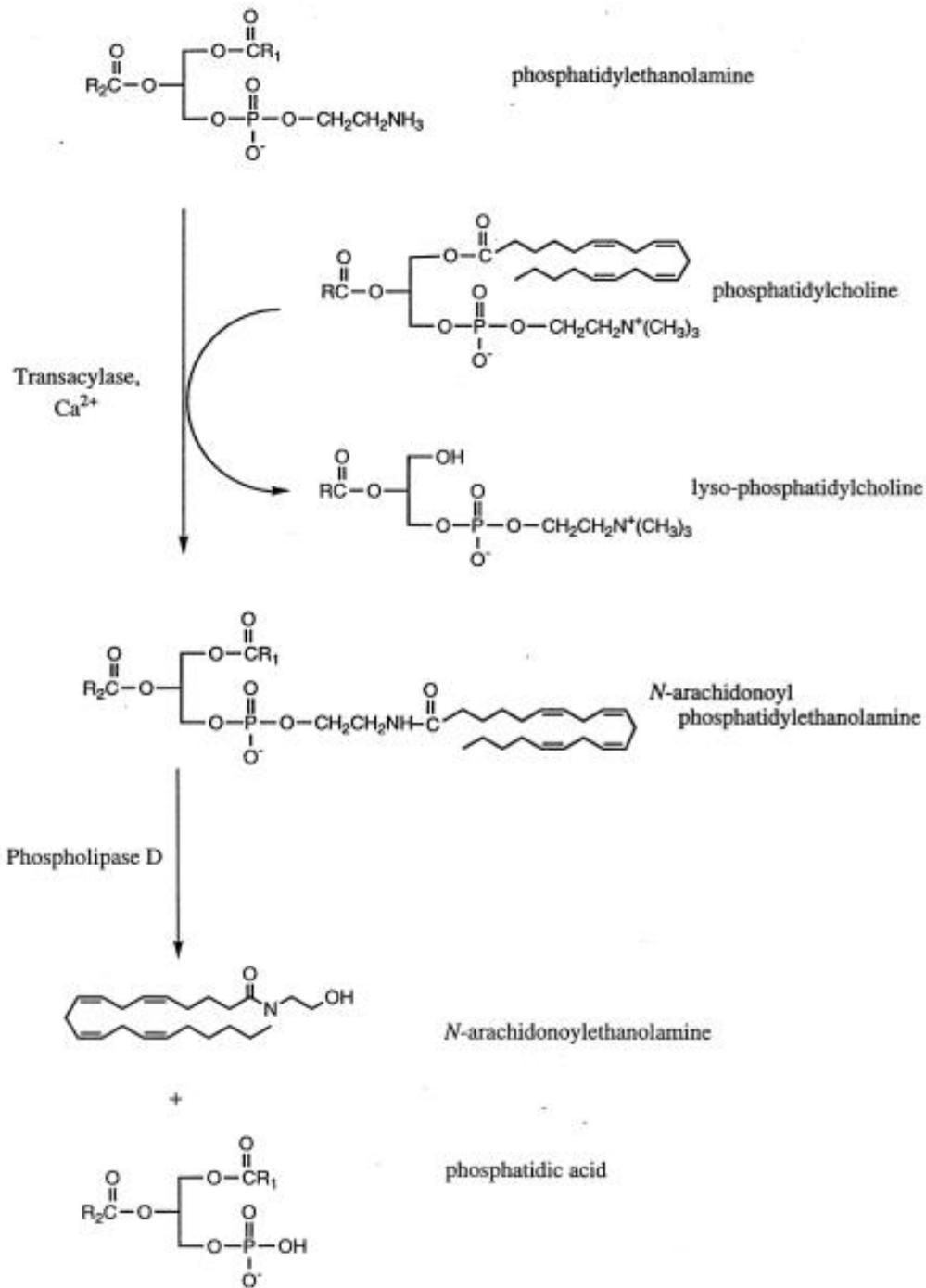


Figura 1. Mecanismo de síntesis de AEA a partir de Fostatidiletanolamida (Hillard, 2000).

1.2. Receptores para cannabinoides

La amplia distribución de los receptores de cannabinoides en el organismo sugiere un papel importante en la regulación de funciones vitales. Los receptores CB1 y CB2 pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), cuentan con siete segmentos transmembranales y tienen 3 asas intermembranales y 3 extracelulares (ver Fig 2) (Rodríguez *et al.* 2005). Los receptores cannabinoides CB1 son los GPCR más abundantes y extensamente distribuidos del cerebro. Los CB1 se encuentran principalmente en las neuronas del cerebro, la médula espinal y el sistema nervioso periférico, aunque también están presentes en ciertos órganos y tejidos periféricos, como glándulas endocrinas, glándulas salivales, leucocitos, bazo, corazón y en determinadas zonas de los aparatos reproductor, urinario y gastrointestinal. Hay muchos receptores CB1 en las terminaciones de los nervios, tanto centrales como periféricos, e inhiben la liberación de otros neurotransmisores. Los receptores CB1 se hallan en abundancia en las regiones del cerebro responsables del movimiento (ganglios basales, cerebelo), del procesamiento de la memoria (hipocampo y corteza cerebral) y de la modulación del dolor (ciertas partes de la médula espinal, sustancia gris periacueductal). Los receptores CB2 se encuentran principalmente en las células inmunitarias, entre ellas los leucocitos, el bazo y las amígdalas.

Una de las funciones de los receptores CB en el sistema inmunitario es la modulación de la liberación de las citoquinas, responsables de la inflamación y la regulación del sistema inmunológico. Puesto que los compuestos que activan selectivamente los receptores CB2 (los agonistas de los receptores CB2) no causan efectos psicológicos, se está convirtiendo cada vez más en blanco de la investigación de las aplicaciones terapéuticas de los cannabinoides, como pueden ser sus efectos analgésicos, antiinflamatorios y antineoplásicos. Aumenta la evidencia de la existencia de más subtipos de receptores cannabinoides en el cerebro y la periferia (Grotenhermen, 2006). La localización de estos receptores en varias regiones del cerebro influye sobre el placer, la memoria, la concentración, la percepción sensorial y del tiempo, el movimiento coordinado, y la ingesta de alimentos. Dada la relación que tiene el SEC con la regulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos (Scheen *et al.* 2006), recientemente se han propuesto el uso de inhibidores y bloqueadores de la actividad de los receptores CB1 y CB2 como un control de la ingesta de alimentos en pacientes con obesidad y diabetes (Lipina *et al.*, 2012).

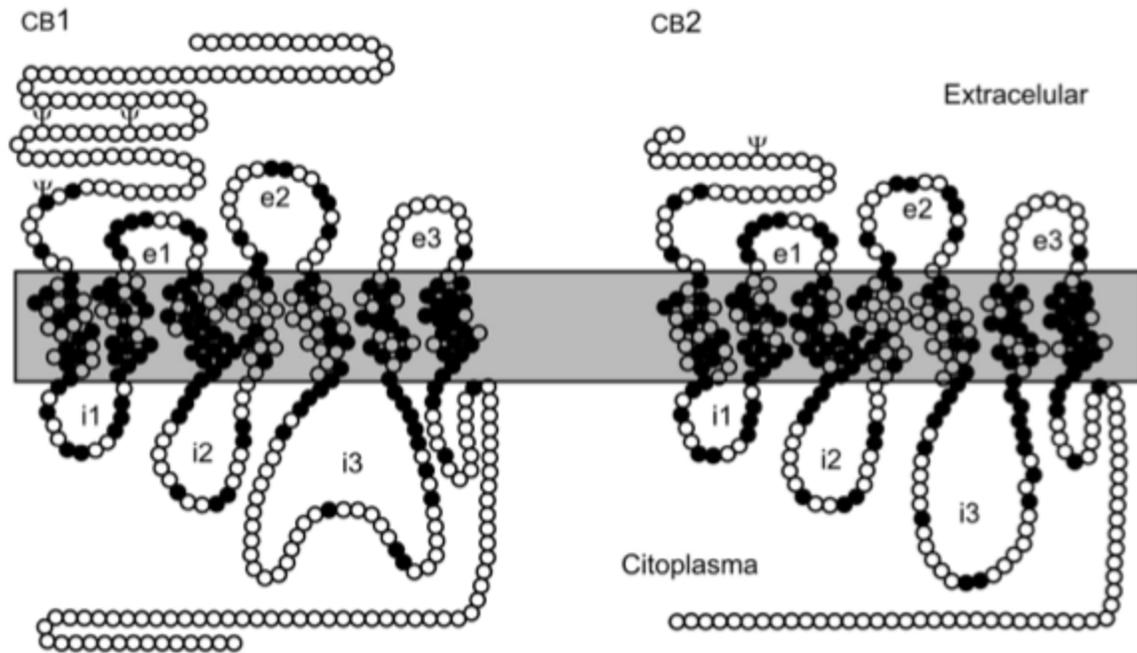


Figura 2.- Receptores Cannabinoides, mostrando los 7 dominios transmembranales (Rodríguez *et al.* 2005)

1.2.1. Receptor CB1 (CB1)

El CB1 tiene la estructura y las características bioquímicas de los GPCR, la activación del CB1 tiene como consecuencia una disminución en la actividad de la adelinil ciclasa, la disminución de la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje y la activación de varios tipos de canales de potasio (Hillard, 2000). En el humano y en la rata, este receptor tiene 61 aminoácidos menos en el extremo amino terminal que el CB1, y de acuerdo con ello se nombraría CB1b (Rodríguez *et al.* 2005).

El receptor CB1 regula los efectos psicoactivos de los cannabinoides en la membrana pre-sináptica al modular la liberación de algunos neurotransmisores, como dopamina, noradrenalina, glutamato, GABA y serotonina. Estudios autorradiográficos han demostrado que el receptor CB1 se encuentra densamente localizado en núcleos como el hipocampo, la corteza, los ganglios basales (estriado, globo pálido y *sustancia nigra*) y el cerebelo, siendo el receptor más abundante de los acoplados a proteínas G en el cerebro de los mamíferos. En menor densidad, se encuentra en hipotálamo y médula espinal, en el sistema nervioso periférico, los testículos, el sistema inmune, las glándulas adrenales, la médula ósea, el corazón, los vasos sanguíneos, el pulmón, la próstata, el timo, las

amígdalas y el bazo. Este receptor, además de disminuir la formación de AMPc, puede regular las corrientes de los iones esenciales para el control de la liberación de neurotransmisores, debido a que bloquean los canales de Ca^{2+} tipo N y P/Q, y puede aumentar la acción de los canales de K^+ independientes de voltaje, ocasionando la inhibición en la liberación de neurotransmisores. Actualmente, existen varias evidencias que indican al receptor CB1 como regulador negativo a la adenilato ciclasa por medio de una proteína G inhibitoria: **A)** La administración de cannabinoides agonistas del receptor CB1, como el CP-55940 tanto *in vivo* como *in vitro*, disminuye la concentración de AMPc; **B)** En estudios de unión a ligando en cerebros de ratas, se ha demostrado que la distribución de [3H]-forskolina que estimula la actividad de la adenilato ciclasa al unirse a ella- es homogénea a la localización del [3H]-CP-55940 (58); **C)** En sinaptosomas de cerebro de rata, en células GH4C1 de rata y en células NG108-15 de ratón donde se activa a los receptores CB1 con WIN55212-2, un agonista parcial del receptor CB1, se ha demostrado que al utilizar SR141716A, un antagonista CB1, disminuye la inhibición de la concentración de AMPc ocasionada por el agonista; **D)** La habilidad de los cannabinoides para inhibir la producción de AMPc es atenuada por la administración de toxina *pertussis*, la cual es una proteína que inhibe a las PGI/o al prevenir la disociación de la subunidad α del complejo β/γ , bloqueando así su actividad sobre la adenilato ciclasa (Netzahualcoyotzi-Piedra *et al.* 2009).

Con los estudios de unión a ligando, ha sido posible determinar la presencia de los receptores CB1 cuando son activados por agonistas cannabinoides, por compuestos sintéticos similares o por los endocannabinoides. Se ha demostrado que la administración crónica de $\Delta 9$ -THC en ratas normales induce tolerancia, y que este efecto farmacológico se debe a una disminución en la unión del agonista al receptor, lo cual se demuestra en los estudios de unión a ligando. Por otra parte, se ha sugerido que la coactivación de los receptores CB1 y D2, dependiendo de las condiciones de experimentación, puede ocasionar un cambio en el acople a proteínas G de los receptores CB1, como se demostró en cultivos de neuronas estriatales estimuladas simultáneamente con HU210 (agonista del receptor CB1) y quinpirole (agonista D2), donde aumentaron los niveles de AMPc. Estos datos dan indicios de que los receptores CB1 pueden acoplarse también a proteínas del tipo Gs cuando es activado conjuntamente con los receptores D2, aportando más evidencias de la relación entre el SEC y las neuronas dopaminérgicas. (Netzahualcoyotzi-Piedra *et al.* 2009).

1.2.2. Receptor CB2

El receptor CB2 es una proteína de 360 aminoácidos que también pertenece al grupo de receptores unidos a proteínas Gi/o, por lo que su activación está involucrada en la modulación de la adenilato ciclasa. Sin embargo, este receptor no inhibe los canales de Ca^{2+} ni sobreestimula la salida de K^+ , como ocurre con los CB1, pero se ha visto asociado con la activación de la vía de las MAP cinasas. La naturaleza de este receptor se ha conocido mejor debido a la utilización de WIN55212-2, ya que este aminoalquilindol es más afín a este receptor que al CB1. Su principal localización es en las células inmunes presentes en órganos linfoides como el bazo, el timo, las amígdalas, la médula ósea, en células mieloides, macrófagos y monocitos del bazo, y en leucocitos de sangre circulante (eritroides, macrófagos, mastocitos y linfocitos T y B). También se ha demostrado que CB2 está presente en el corazón y en la microglía del sistema nervioso central, asociado directamente con el proceso de la neuroinflamación. Al igual que su homólogo CB1, su actividad se minimiza al utilizar toxina *pertussis*. El estudio de este receptor no ha sido tan profundo como en el caso del receptor CB1; sin embargo, su presencia en las células inmunes es importante para llevar a cabo la regulación de la respuesta inflamatoria inmune (Netzahualcoyotzi-Piedra *et al.* 2009).

Además de modular el comportamiento del apetito a nivel del sistema nervioso central, cada vez existen más evidencias de que el SEC también está involucrado en varios procesos que regulan el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Matías *et al.* 2007; Li *et al.* 2011). Aunque el SEC se ubica mayormente en el cerebro, se ha descrito la presencia de los receptores y enzimas asociadas a los endocannabinoides en células del tejido adiposo, del hígado, y en los islotes pancreáticos (Bermudez-Silva *et al.* 2007). En diversos modelos animales se ha observado que la activación de los receptores CB1 y CB2 participa en la regulación de la homeostasis de la glucosa, en la actividad de la lipoproteína lipasa de los adipocitos, y en la lipogénesis en los hepatocitos (Li *et al.* 2011). Por otro lado, la alteración del SEC se ha asociado con el desarrollo de obesidad, dislipidemia y diabetes, lo que ha conducido a considerar a los antagonistas de los receptores cannabinoides como un posible tratamiento para estos desordenes metabólicos (Bermudez-Silva *et al.* 2007; Anderson *et al.* 2013).

2. Islotes pancreáticos

El páncreas del adulto es un órgano retroperitoneal de orientación transversal que se extiende desde el asa en "C" del duodeno hasta el hilio del bazo. Como promedio, este órgano mide 15-20 cm de longitud y pesa de 35 a 50 g. La vascularización adyacente puede utilizarse para dividirlo en cuatro partes: cabeza, cuello, cuerpo y cola.

Esta glándula presenta una doble función: la porción exocrina la conforman las células acinares y los conductos en donde se secretan enzimas (proteasas, lipasas, amilasas y nucleasas) necesarias para la digestión y bicarbonato. Las células acinares son de características epiteliales de forma piramidal, que adoptan una orientación radial alrededor de una luz central. Contienen gránulos de zimógeno rodeados por una membrana y cargados de enzimas digestivas.

El páncreas endocrino representa el 2% de la masa total del órgano, con alrededor de un millón de agregados de células llamados islotes de Langerhans. Contienen cinco tipos principales y dos secundarios de células que se distinguen por las características ultraestructurales de sus gránulos y por su contenido hormonal (Brandan, *et al.* 2011).

Los cinco tipos celulares que constituyen al islote son:

- Células α : Secretan glucagón que produce hiperglucemia por su actividad glucogenolítica en el hígado.
- Células β : Producen insulina, hormona hipoglucemiante.
- Células δ : Contienen somatostatina que suprime la liberación de insulina y de glucagón.
- Células PP: Contienen un polipéptido pancreático exclusivo con diversas acciones digestivas como estimular la secreción de enzimas gástricas e intestinales e inhibir la motilidad intestinal.
- Células ϵ : Secretan ghrelina.
- Células endoteliales (Tejido secundario): Forman parte de los capilares fenestrados.

La insulina es una hormona peptídica, secretada exclusivamente por las células β del islote pancreático, cuya importancia es relevante en la homeostasis de la glucemia y su relación con la diabetes mellitus (DM). Está formada por dos cadenas peptídicas A y B, de

21 y 30 aminoácidos respectivamente, unidas mediante enlaces covalentes, por dos puentes disulfuro, y un puente intracatenario. La insulina se sintetiza a partir de una molécula precursora, la preproinsulina, procesada en el retículo endoplásmico rugoso (RER), donde una peptidasa escinde el péptido señal de la misma, generando la molécula de proinsulina. Ocurre entonces un plegamiento que deja alineados los puentes disulfuro entre las cadenas A y B de la misma. Posteriormente la molécula de proinsulina se transporta al aparato de Golgi, donde se empaqueta en gránulos de secreción. Durante la maduración de éstos, actúan dos endopeptidasas (PC1 y PC2, enzimas dependientes de calcio que precisan un pH ácido) y una carboxi-peptidasa H que escinden la proinsulina en insulina y péptido C. En el interior del gránulo la insulina cristaliza en hexámeros, en presencia de zinc y en un medio ácido. El péptido C y otros compuestos también presentes en el gránulo no se cristalizan, formando un halo característico alrededor de un núcleo compacto compuesto por los hexámeros. La insulina es secretada por las células β mediante exocitosis en cantidades equimolares con el péptido C, para ello los gránulos tienen que ser transportados a través del citoesqueleto de microfilamentos y microtúbulos existentes en ella hasta la superficie de la célula β .

El proceso de secreción de insulina está regulado mediante señales generadas por nutrientes, neurotransmisores y hormonas. Entre los nutrientes, la glucosa es el principal regulador fisiológico de la secreción de insulina. La glucosa entra en la célula β mediante un transportador GLUT 2, que permite la entrada rápida de la misma a concentraciones fisiológicas. En el interior de la célula se fosforila a glucosa-6-P por la glucocinasa; esta enzima se considera el verdadero sensor de glucosa de la célula β , ya que su actividad es esencial para la estimulación de la secreción de insulina mediada por glucosa. El metabolismo de la glucosa se continúa por glucólisis y ciclo de Krebs hasta la generación de ATP. El incremento en la relación ATP/ADP cierra los canales de potasio dependientes de ATP, de forma que el potasio se acumula en el interior de la célula, esto conduce a la despolarización de la membrana celular, al cambio de la corriente iónica y a la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje. Al aumentar la concentración intracelular de este catión, se activan varias proteínas asociadas al citoesqueleto que movilizan los gránulos de secreción de insulina hacia la membrana. Además de la glucosa, ciertos aminoácidos pueden estimular también la secreción de insulina, o bien potenciar la respuesta a glucosa. Muchas hormonas tienen un efecto regulador de la secreción de insulina, entre ellas las otras hormonas secretadas por el islote mediante un efecto

parácrino y el efecto estimulador mediado por las hormonas gastrointestinales, denominado efecto incretina (Brandan, *et al.* 2011).

Los elementos del SEC han sido identificados en las células α , β y δ en los islotes pancreáticos de humano, ratón y rata (Li, *et al.*, 2010, 2011, 2012). Se ha reportado que agonistas del receptor CB1, tales como el Δ -9-tetrahidrocannabinol (THC) y sus análogos, promueven la liberación basal de insulina e incrementa el estímulo inducido por la glucosa (Bermúdez *et al.*, 2009). A pesar de que existen controversias sobre el efecto en la secreción de hormonas, son claras las evidencias que indican el papel fisiológico del SEC en el islote pancreático (Li, *et al.*, 2011).

Un gen primordial es PDX-1 que regula la transcripción del gen de la insulina y otros genes involucrados en la detección de la glucosa como la glucocinasa o el GLUT2, ayuda primordialmente a la diferenciación celular de los tipos celulares del islote pancreático, se ha detectado que la carencia de PDX-1 produce una apoptosis temprana de islotes y una disminución de la masa del islote, por lo que se infiere que PDX-1 es esencial para regular la homeostasis del islote (Kaneto y Matsuoka, 2015). PDX-1 está involucrado directamente con el SEC ya que este ayuda a la proliferación y regeneración de las células que lo componen.

Los niveles intracelulares del calcio y la generación de AMPc tienen un rol importante en la modulación de la secreción de insulina en respuesta a diversos estímulos. Hay reportes que asocian la activación del CB1 con el incremento de la secreción basal de insulina (Li *et al.*, 2010, 2011, 2012; Vilches-Flores, 2010), lo cual es consistente cuando la secreción de insulina estimulada por glucosa es inhibida por el antagonista Rimonabant (Getty-Kaushik *et al.* 2009). La secreción de insulina estimulada por glucosa se aprecia disminuida con el agonista selectivo del CB1, ACEA, en islotes aislados de ratón (Li *et al.*, 2011), sin embargo, otros reportes siguen un efecto contrario. Con respecto al AMPc tiene una relación directa con el calcio ya que a mayores cantidades de calcio hay una disminución de AMPc, esto es relevante ya que el Ca^{2+} es importante para la secreción de insulina y al disminuir la cantidad de AMPc la anandamida que se sintetiza en dos pasos enzimáticos que se realizan en la membrana postsináptica: en el primero de ellos, se realiza la activación de la N-acetiltransferasa, una enzima dependiente de AMPc que se encarga de catalizar la transferencia del ácido araquidónico de la fosfatidilcolina al grupo cabeza de la fosfatidiletanolamida, formando de esta manera la N-araquidonil-

fosfatiletanolamida (NAPE) que, posteriormente, se hidroliza por acción de una fosfolipasa tipo D (segundo paso) y forma la anandamida (Nezahualcoyotzi-Piedra. 2009).

El SEC por lo tanto puede modular la secreción de insulina y por lo tanto ser una herramienta para el tratamiento de la DM por medio de agonistas y antagonistas de los receptores y enzimas que lo componen (Li, 2011).

3. Diabetes mellitus (DM)

La DM es un grupo de alteraciones metabólicas, caracterizado por la hiperglicemia crónica resultante de la insuficiente secreción de insulina, en su acción inadecuada o ambos. Entre la clasificación se encuentra la DM tipo 1 (DMT1), que consiste en una destrucción autoinmune de las células beta, resultando en una deficiencia absoluta de insulina, su incidencia es bastante baja comparada con la de la DM tipo 2 (DMT2) la cual presentan más del 90% de los pacientes. La DMT2 se caracteriza por una secreción anormal de insulina asociada con varios grados de resistencia a la insulina en diversos órganos. Existe un importante componente genético en el desarrollo de la DM, pero también se ha demostrado que la influencia de factores ambientales puede ser el detonante para que inicie la disfunción gradual del islote, que va de la compensación con hiperinsulinemia hasta la deficiencia (Marchetti *et al.* 2008; Kulkarni, 2004).

La DMT2 es la primera causa de muerte en México, y por lo tanto, un serio problema de salud pública. Actualmente se cuentan con varias opciones terapéuticas para controlar el desarrollo de la diabetes, tales como el cambio en el estilo de vida con dieta y ejercicio, el tratamiento farmacológico con hipoglucemiantes, e incluso el trasplante de islotes pancreáticos. Aun así, continúa la investigación sobre nuevas alternativas terapéuticas que ayuden a mejorar la calidad de vida del paciente diabético (Arias-Díaz *et al.* 2001). Recientemente se ha propuesto el uso de reguladores farmacológicos del SEC como una nueva alternativa de tratamiento en la DMT2 y el síndrome metabólico. Matías *et al.* (2006) observaron la función del SEC en un modelo con obesidad e hiperglicemia observando que el CB1 participa directamente en la acumulación de grasa y diferenciación celular.

ANTECEDENTES

A mediados de la década pasada, el antagonista del receptor CB1 denominado rimonabant (SR141716A) fue propuesto como tratamiento para el sobrepeso y la obesidad, en pacientes con síndrome metabólico y DMT2, observándose una reducción significativa del apetito, de la lipogénesis y un mejoramiento metabólico. Existen evidencias sobre los efectos farmacológicos del rimonabant sobre la secreción de insulina, sin embargo, son pocos los estudios que lo demuestran directamente sobre el tejido pancreático endocrino. En islotes aislados de ratas Zucker diabéticas, el rimonabant a concentración de 1 μ M disminuyó casi 50% la secreción de insulina estimulada por glucosa, mientras que en ratas obesas se incrementó un 30% (Getty-Kaushik *et al.* 2009). En otro estudio donde se administró una dosis de 10 mg/kg/día de rimonabant durante 15 días y 3 meses, no se observaron cambios en los niveles de insulina sérica tras una curva de tolerancia a la glucosa, sin embargo, se observó una disminución significativa en la superficie correspondiente a los islotes, y una menor desorganización de éstas estructuras con respecto al control diabético (Duvivier, *et al.*, 2009).

Debido a sus efectos secundarios, tales como ansiedad y depresión, el rimonabant fue retirado del mercado farmacéutico (McLaughlin, 2012). Buscando una alternativa, en nuestro grupo de trabajo se sintetizó un análogo del rimonabant al cual denominamos BAR-1 (1-(4-cloropfenil) -2- (2, 4-diclorofenil) -N- (1-piperidinil) -1H-benzimidazole -5-carboxamida). En una evaluación preliminar realizada en islotes pancreáticos de rata se observó que el tratamiento por 1 hora con 1 μ M de BAR-1 a 3 mM de glucosa, bloquea parcialmente los efectos de anandamida sobre la abundancia de mRNA de insulina, además de potenciar la secreción de insulina en respuesta a 16 mM de glucosa (Vilches-Flores *et al.*, 2010). Recientemente obtuvimos un análogo sintético de palmitoil-etanolamida denominado HD y se evaluó su posible uso como fármaco analgésico (Roa-Coria, 2012). A pesar de ser inhibidor competitivo débil de la enzima FAAH, es posible que module indirectamente la actividad de los receptores CB1 y CB2.

Es evidente que el SEC presenta una función fisiológica en el islote pancreático, relacionada tanto con la expresión como con la secreción de insulina en respuesta a glucosa. En el presente proyecto evaluaremos el papel que desempeña el SEC en la fisiología de islotes pancreáticos aislados de ratones, tanto sanos como dentro de un modelo de síndrome metabólico, empleando como estrategia el uso de agonistas y antagonistas sintéticos de algunos de los receptores y enzimas que lo integran.

HIPÓTESIS:

En los islotes pancreáticos, la actividad del SEC modulada por agonistas y antagonistas sintéticos modifica la expresión genética de los mismos elementos del SEC, de genes específicos del islote, y la secreción de insulina en respuesta a glucosa.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto de agonistas y antagonistas sintéticos del sistema endocannabinoide sobre la expresión genética y la secreción de insulina, en islotes pancreáticos aislados de ratón.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Analizar los efectos de anandamida, el inhibidor sintético de FAAH (HD), Rimonabant y su analogo sintético BAR-1, sobre la secreción de insulina estimulada por glucosa, en cultivos primarios de islotes pancreáticos de ratón.
- Determinar la expresión genética de preproinsulina, preproglucagon, PDX-1, CB1r, CB2r, DAGL, MAGL, NAPE-PLD y FAAH del islote pancreático, tratado bajo diferentes condiciones de glucosa, en presencia o ausencia de anandamida, el inhibidor sintético de FAAH (HD), BAR-1 y Rimonabant.
- Examinar los efectos en secreción de insulina y expresión genética, de islotes aislados de ratones bajo un modelo de síndrome metabólico, con la administración farmacológica de BAR-1.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Síntesis y purificación de rimonabant, BAR-1 y HD. Estos compuestos se sintetizaron y purificaron en la Facultad de Farmacia, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo los procedimientos establecidos previamente por el Dr. Gabriel Navarrete.

Aislamiento de islotes pancreáticos de ratón CD-1 sano. Se trabajó con ratones macho de la cepa CD-1, de 4 a 6 semanas de edad, mantenidos en el bioterio de la FES Iztacala en condiciones controladas, con alimento y agua *ad libitum*. Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de anestesia, y se removió el páncreas inyectando una solución de colagenasa tipo IV a través del conducto biliar-pancreático. El tejido fue digerido a 37°C y los islotes se aislaron empleando un gradiente discontinuo de Histopaque-1077. Después de una selección manual, los islotes fueron mantenidos en medio de cultivo DMEM con glucosa 5 mM, suplementado con SBF al 10% y antibióticos al 3%, en una incubadora a 37°C con 5% CO² por 24 h. El manejo de desechos y residuos biológico-infeccioso de animales fue dispuesto de acuerdo a las especificaciones de la Comisión de Ética y Bioseguridad, y del bioterio, de la FES Iztacala de la UNAM.

Expresión genética. Los islotes se dividieron en grupos de 150 a 200, y se trataron durante una hora, con anandamida, rimonabant, BAR-1 y HD, solos y en combinaciones, a concentraciones de 10 µM, en condiciones de baja (5 mM) glucosa en el medio. El RNA total de los islotes se obtuvo con reactivo de Trizol y precipitación con cloroformo / isopropanol / etanol, y se cuantificó por espectrofotometría a 260/280 nm. El cDNA se obtuvo por la reacción de reverso transcriptasa (RT) a partir de 2 µg de mRNA total, y con 20 ng de muestra se evaluó por PCR en tiempo real (qPCR), la expresión relativa de preproinsulina, preproglucagon, PDX-1, CB1r, CB2r, DAGL, MAGL, NAPE-PLD y FAAH, empleando rRNA 18s como control endógeno. Los resultados fueron analizados por el método de doble-delta CT ($\Delta\Delta CT$) (Livak y Schmittgen, 2001).

Secreción de insulina. Grupos de 10 islotes se pre-incubaron una hora en solución de Krebs-Singer con 3 mM de glucosa. Posteriormente se dividieron en grupos de 5 islotes para ser tratados durante una hora con anandamida, rimonabant, BAR-1 y HD, solos y en combinaciones, a concentraciones de 10 µM, en condiciones de concentraciones baja (5 mM) y alta (20 mM) de glucosa. Se recuperaron 50 µL del medio para la cuantificación de insulina empleando un kit comercial ALPCO Mouse Insulin ELISA 80-INSMS-E01 E10.

Evaluaciones en el modelo de síndrome metabólico, *in vivo* y *ex vivo*. Sesenta ratones de la cepa CD-1 fueron divididos en seis grupos de diez sujetos para su tratamiento por cuatro y ocho semanas: dos grupos tratados vía oral con 10 mg/kg/día de BAR-1 en DMSO al 10% (vehículo), bajo una dieta con 30% de grasa y solución de sacarosa al 20%; dos grupos bajo la misma dieta hipercalórica con la administración del vehículo; y dos grupos control en condiciones estándar de bioterio más vehículo. Al término de las 4 y 8 semanas se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa empleando un glucómetro One-Touch UltraMini (LifeScan Johnson&Johnson), se determinaron triglicéridos en sangre con un glucómetro Accutrend GCT (Roche) y se cuantificó la insulina sérica a tres ratones de cada grupo por medio de un kit de ELISA (ALPCO). Los animales fueron sacrificados al día siguiente, obteniendo los islotes pancreáticos para el análisis de la expresión genética y la secreción de insulina *in vitro*. La nomenclatura de los grupos experimentales es BAR-1: organismos tratados con Bar-1 y una dieta hipercalórica; Dieta: organismos tratados con una dieta hipercalórica y el vehículo; Control: organismos tratados con el vehículo.

Estadísticos de prueba. Se calcularon promedios y errores estándar de los datos obtenidos, y se utilizó un análisis estadístico de ANOVA y t-student, con un nivel de significancia de $p < 0.05$, para evaluar las diferencias entre los tratamientos con respecto a los controles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la Figura 3 podemos apreciar una diferencia de peso entre los ratones tratados con BAR-1 y Dieta con respecto al control hasta la semana tres, donde a partir de este punto se igualan entre los tres grupos experimentales. En la Figura 4 se observan los incrementos de peso de los ratones en un periodo de ocho semanas, los tres grupos presentan un incremento similar sin diferencia significativa, salvo hasta la última semana donde el grupo tratado con BAR-1 tiene un mayor aumento de peso comparado con el grupo control; Duvivier (2009) reporta cambios similares con diferencia significativa desde la semana dos, pero empleando un modelo de ratas Zucker, mientras que Starowicz (2008) obtuvo resultados más significativos en ratones bajo una dieta alta de grasas. En nuestro modelo hay que considerar la edad con la que inició, ya que los animales aún están en una etapa de crecimiento. Por otro lado es posible que la solución de sacarosa de los grupos con dieta sea suficiente para satisfacer la demanda energética, ya que observamos que la ingesta de nutricubos con grasa era aparentemente menor. A pesar de que no observamos diferencia en la longitud (cabeza–cola), si apreciamos un tamaño más grande en los ratones con la dieta hipercalórica (Figura 13).

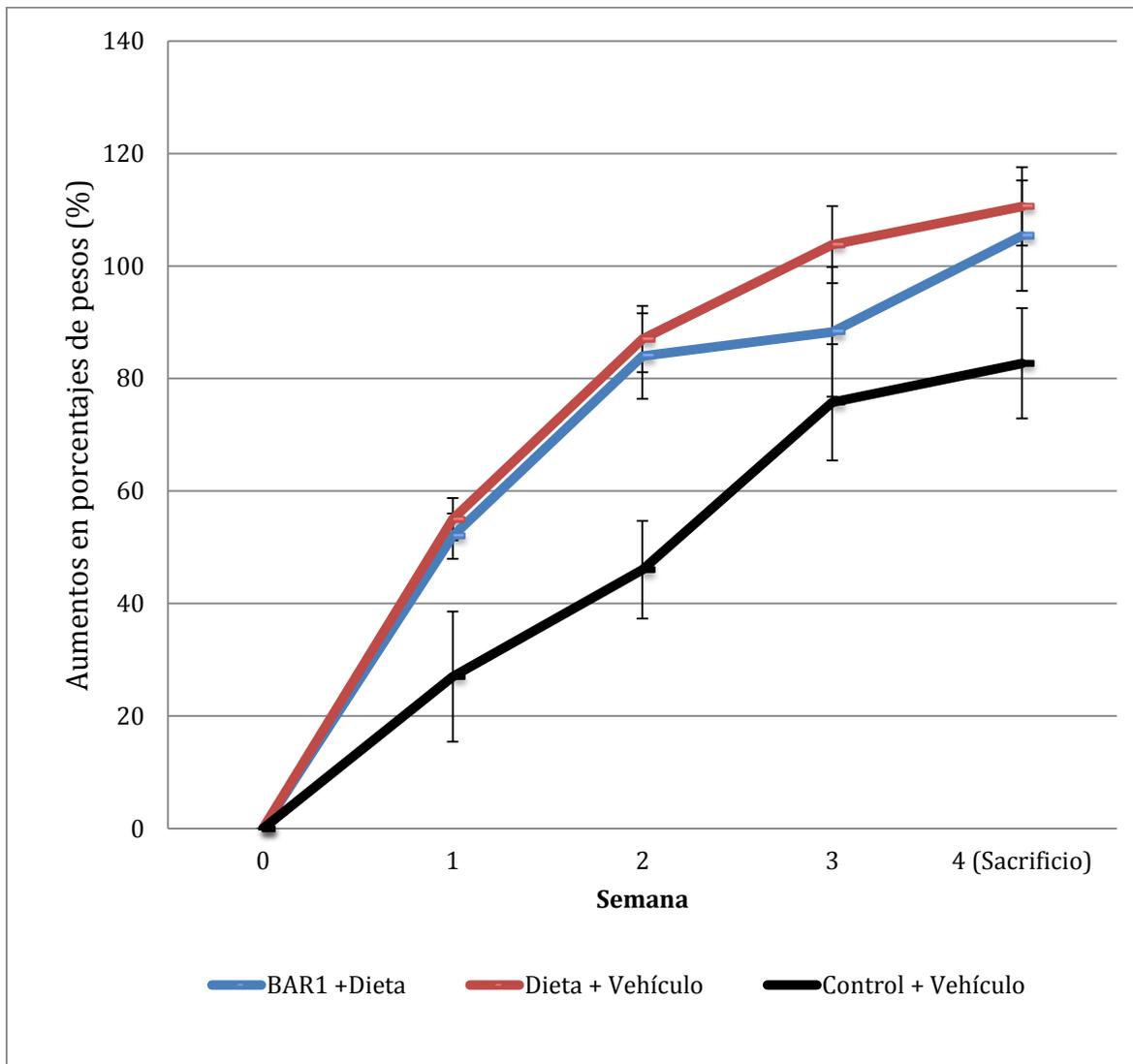


Figura 3 Aumento porcentual de pesos de los ratones del experimento a cuatro semanas de tratamiento, datos expresados en promedio con error estándar (n=10) (P = 0.05 t student).

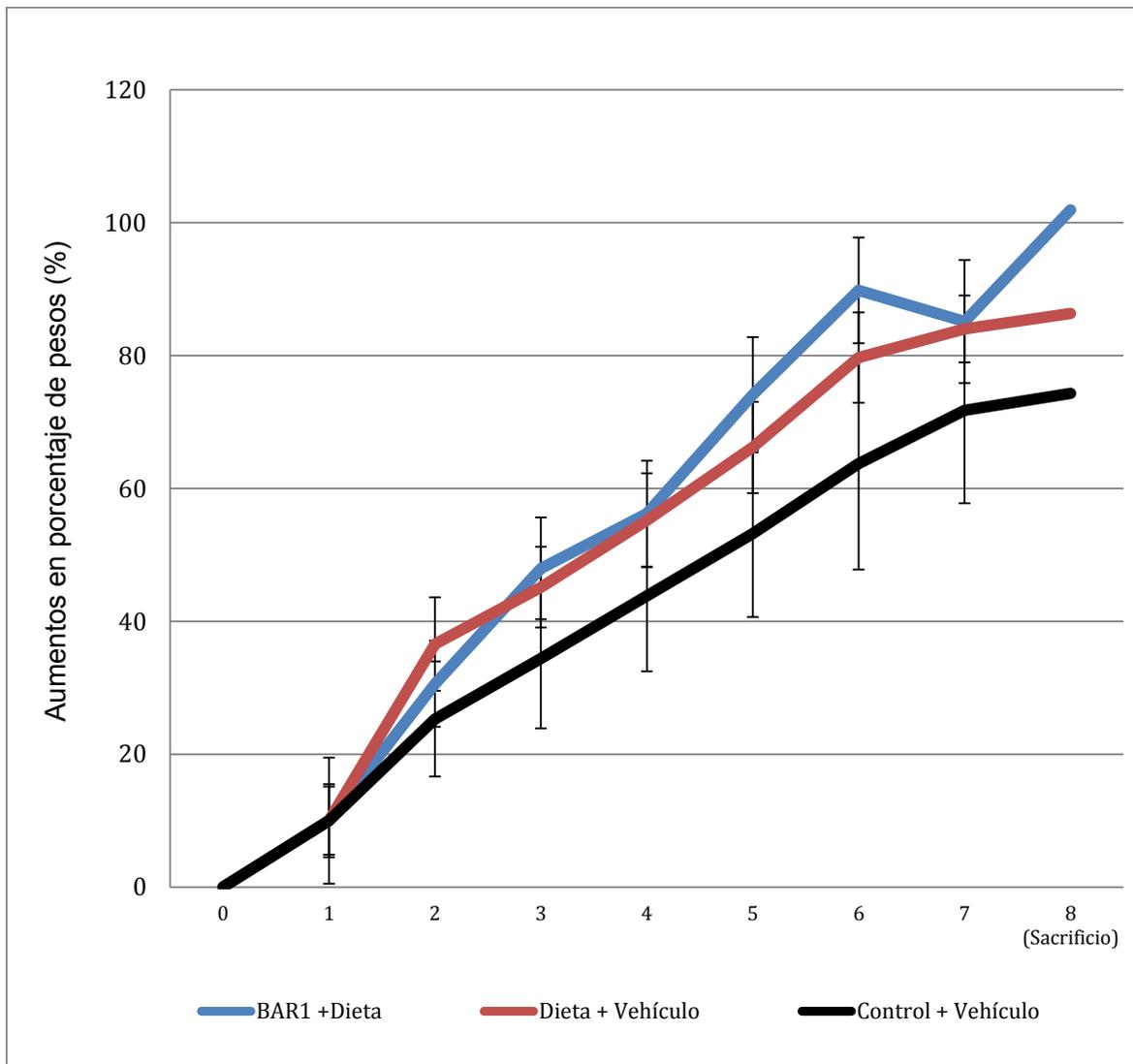


Figura 4 Gráfica de aumento porcentual de pesos de los ratones del experimento ocho semanas de tratamiento, datos expresados en promedio con error estándar (n=10) (P = 0.05 t student).

Las curvas de tolerancia a la glucosa de los ratones tratados por cuatro semanas (Figura 5), el grupo con BAR-1 mostró una diferencia significativa con respecto al control al minuto 60, esto nos indica un posible defecto en la secreción de insulina, aunque en el minuto 90 este se homogeniza con los otros dos grupos. A las 8 semanas (Figura 6) la curva de tolerancia a la glucosa de los ratones tratados con dieta mostró una alteración en la fase sostenida de la curva glucosa (minuto 60) por lo que se puede sugerir un problema en la secreción de insulina; en el grupo BAR-1 también observamos un incremento en este punto, lo que podría sugerir un principio de resistencia a la insulina causado principalmente por la dieta alta en carbohidratos y lípidos a la que fueron sometidos los organismos.

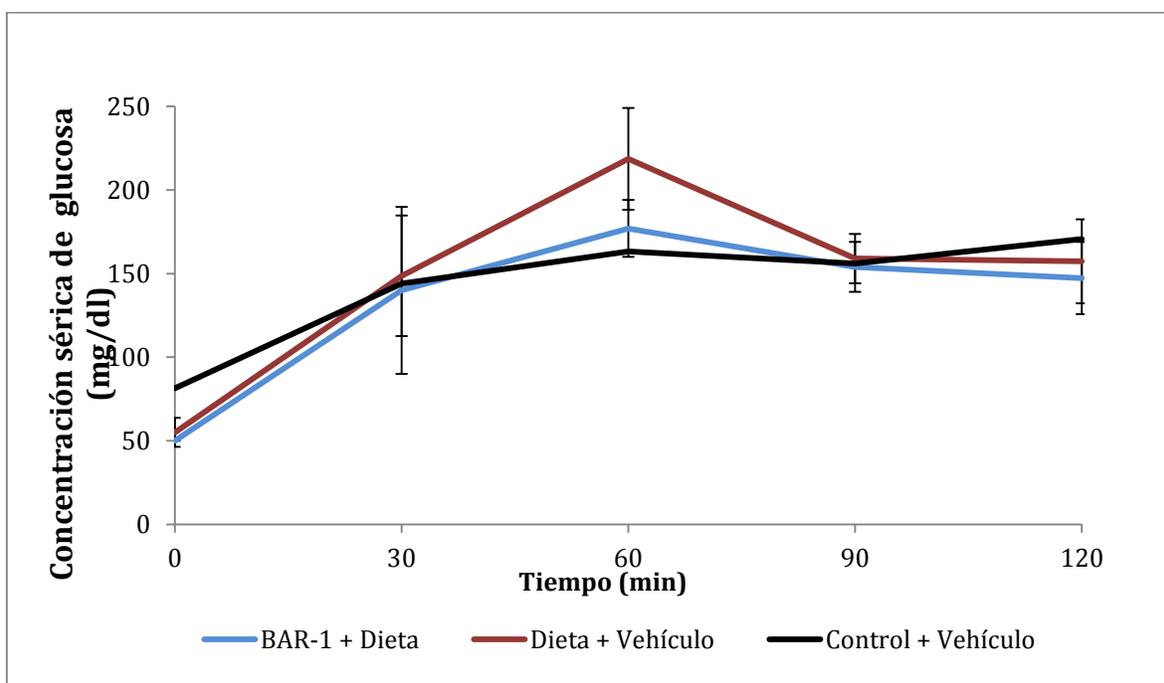


Figura 5 Curva de tolerancia a la glucosa (mg/dL) de ratones bajo tratamiento de cuatro semanas, datos expresados en promedio con error estandar (n=3) (P = 0.05 t student).

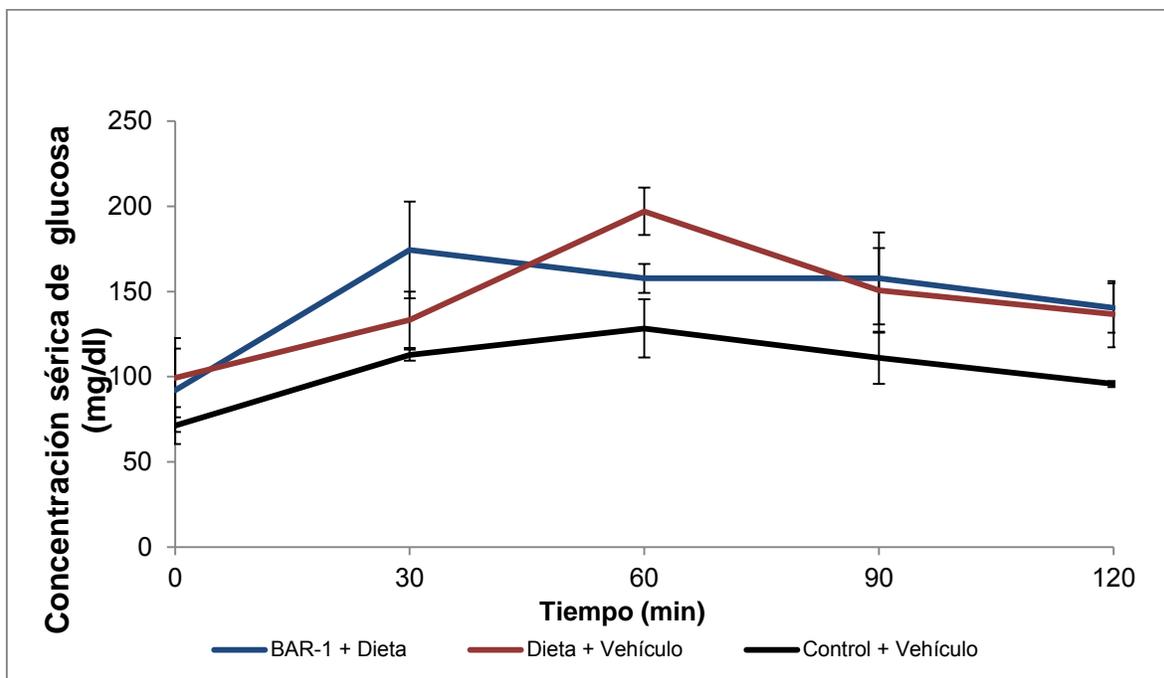


Figura 6 Curva de tolerancia a la glucosa (mg/dL) de ratones bajo tratamiento de ocho semanas, datos expresados en promedio con error estandar (n=3) (P = 0.05 t student).

Los niveles de triglicéridos en sangre de los ratones a las cuatro semanas (Figura 7) no presentan diferencia significativa entre los grupos, sin embargo a las ocho semanas (Figura 8) se aprecia una diferencia significativa ($P < 0.05$) del grupo Dieta y BAR-1 con respecto al control debido a la gran cantidad de carbohidratos y lípidos de lo que constaba la dieta, aunque entre grupos no se aprecia ninguna diferencia significativa ($P = .096$) lo cual indica que no hay efecto del tratamiento con BAR-1, posiblemente debido a que la medición estos haya sido con partículas grandes ya que como muestran los estudios RIO (Rimonabant in Obesity) no se observan cambios significativos; sin embargo los pacientes que recibieron el tratamiento de rimonabant mostraron una reducción en la resistencia a la insulina, que puede estar aunado a un aumento en la adiponectina y una disminución de la leptina, la secreción de insulina se mantuvo con el rimonabant pero la sensibilidad era mayor gracias a la adiponectina (Banerji y Tiewala. 2006). Para proyectos futuros es recomendable hacer una cuantificación de leptina y la resistencia que tiene ésta con BAR-1 para elucidar su interacción.

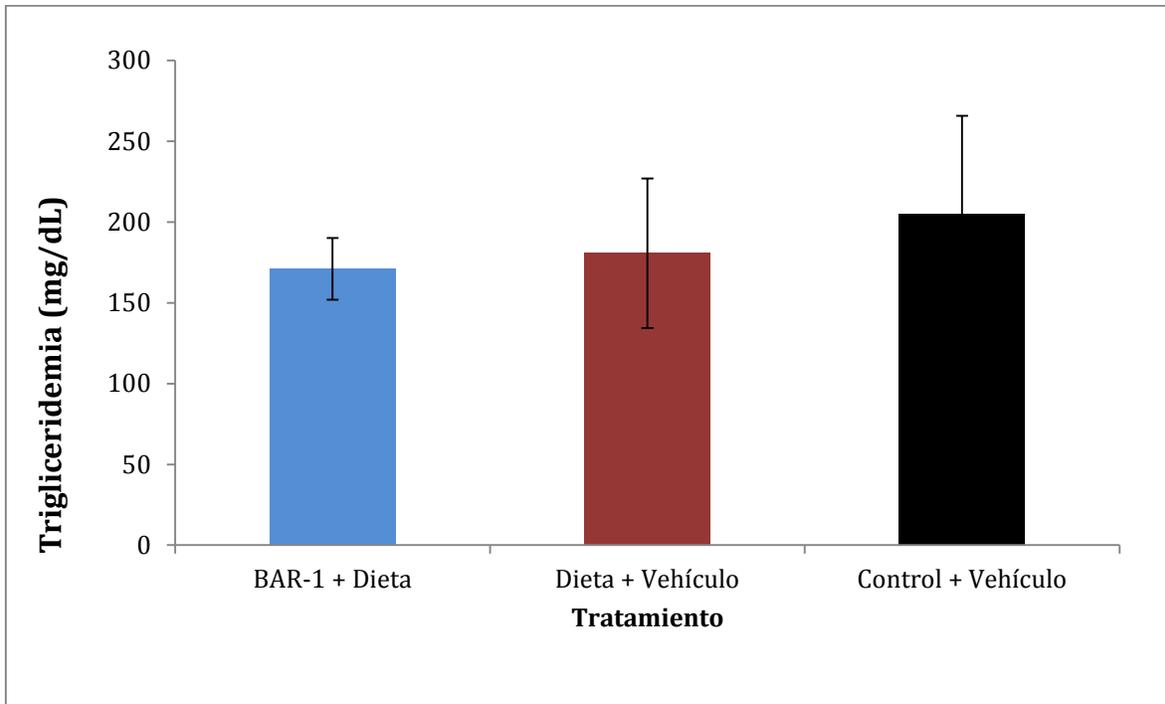


Figura 7, Niveles de trigliceridos en suero (mg/dL) de ratones de cuatro semanas de tratamiento, datos expresados en promedio con error estandar (n=3) (P = 0.05 t student).

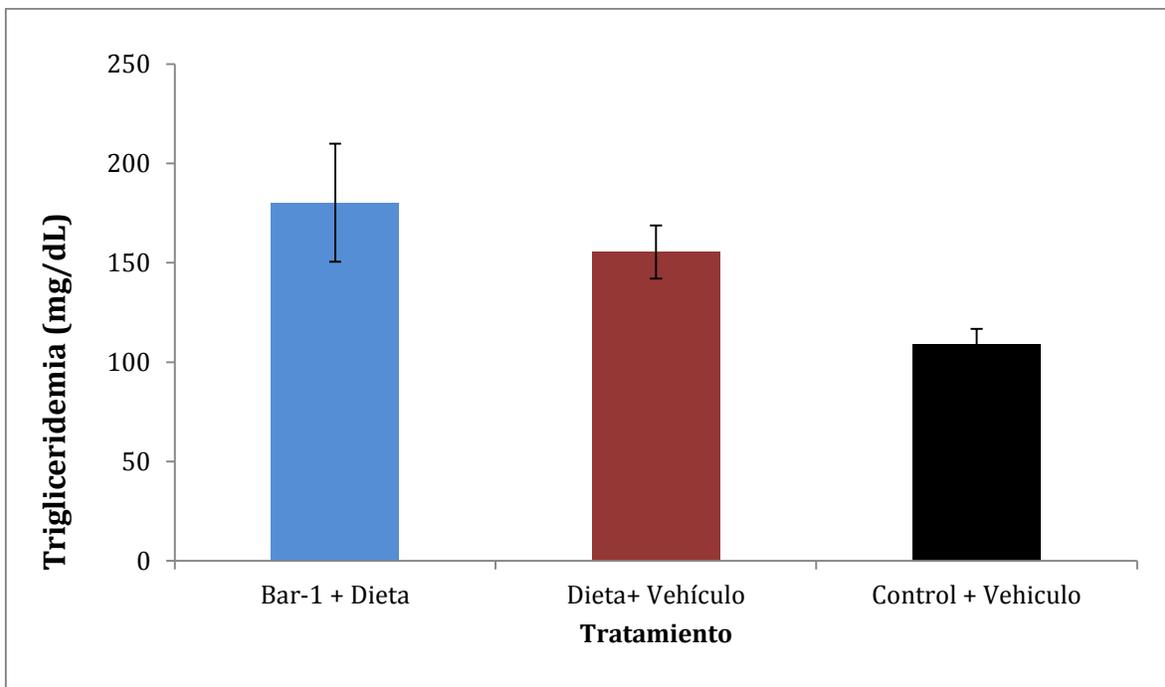


Figura 8, Niveles de trigliceridos en suero (mg/dL) de ratones de ocho semanas de tratamiento, datos expresados en promedio con error estandar (n=3) (P = 0.05 t student).

Podemos observar una tendencia hacia el incremento de peso de los ratones (figura 6 y 8) aunque no de forma significativa (Imagen 13) también estos cambios los podemos apreciar en la gráfica de triglicéridos, esto puede ser consecuencia de la dieta, ya que durante los tratamientos se observó que los ratones con dieta bebían más que los ratones control, aunque la ingesta de alimento era muy similar. La ingesta excesiva de carbohidratos promueve el metabolismo de lípidos y éstos se acumulan en la parte visceral de los organismos, esta grasa extra en los organismos tiene un peso pero es menor que el de la masa muscular, por lo que en cuanto a peso no hubo gran diferencia pero se puede apreciar en la imagen 13 que en volumen si se presenta una diferencia. Podría sugerirse que sería interesante determinar el porcentaje o la proporción de tejido muscular magro con respecto al adiposo.

Entre cuatro y ocho semanas se reduce la expresión genética de la mayoría de los genes por una adecuación a la dieta y es un proceso adaptativo a la dieta por los periodos de estimulación, como puede ser la resistencia de insulina en compensación de una hiperinsulinemia (Kulkarni. 2004). Se sugiere que en un proyecto posterior se realicen cortes histológicos para estudiar los cambios morfológicos.

La administración farmacológica de BAR-1, no induce cambios significativos en los parámetros asociados al desarrollo de síndrome metabólico determinados en nuestro modelo experimental. Debido a la interacción sistémica y a los cambios adaptativos que ocurren, no podemos descartar efectos más discretos en diferentes órganos y tejidos. Sin embargo, los resultados (Vilches-Flores *et al.* 2010) y varias evidencias previas (Roa-Coria, 2012) sugieren un efecto directo sobre la función del islote pancreático.

Podemos observar en la Figura 9, con respecto a la expresión de insulina, en los ratones con dieta el aumento en la expresión genética puede ser una respuesta de compensación del islote pancreático provocado por la dieta para mantener los niveles de glucosa normales. El BAR-1 está modulando la secreción de insulina tendiendo a la normalización comparable al control bajando los niveles de expresión, posiblemente el BAR-1 disminuye el deterioro que se produce en el páncreas, también provocó una reducción en la resistencia a la insulina, que puede ser resultado de un aumento en la adiponectina y una disminución de la leptina, la secreción de insulina se mantuvo con el rimonabant pero la sensibilidad era mayor gracias a la adiponectina; por otro lado, el gen de glucagon en los islotes de los ratones con dieta, presenta un efecto como contraregulador lo que sugiere que posiblemente el efecto de BAR-1 también tiene incidencia sobre las células alfa, el

BAR-1 aumenta directamente a la expresión de insulina, sin embargo fue menos evidente que el grupo con solo la dieta alta en carbohidratos y lípidos, sin embargo, esta dieta disminuye la expresión de glucagón.

La expresión del mRNA del receptor CB1 aumenta por la dieta alta en lípidos y carbohidratos, mientras que BAR-1 la disminuye, posiblemente por un mecanismo de autoregulación negativa; la expresión de CB2 en los islotes es difícil de medir, existen antecedentes que sugieren que la expresión de mRNA de CB2 y de algunas de las enzimas de síntesis y degradación son muy bajas en el islote pancreático (Vilches-Flores, 2013, Starowicz, 2008). BAR-1 disminuye la expresión de CB2 mientras que el de NAPE se eleva, lo que implicaría un aumento en la síntesis de AEA que a su vez está asociado a la expresión de insulina (Scheen *et al.* 2006), el BAR-1 bloquea el CB1/CB2 regulando la acción y posiblemente la síntesis de AEA; los altos niveles de FAAH indican altos niveles de AEA ya que la FAAH se encarga de la degradación de AEA y ésta promueve la secreción de insulina en el sistema, pero al mismo tiempo este aumento retroalimenta a FAAH para la degradación de la AEA. Un aporte interesante, para futuros proyectos sería la posibilidad de medir AEA por medio de un PCR punto final. BAR-1 tiende a disminuir la expresión de CB1 sin embargo no es significativo con respecto al control, pero con respecto al tratamiento se aprecia una diferencia donde el bloqueo de CB1 afecta todo el SEC, se realizaron los experimentos para ver la expresión de DAGL y MAGL, pero la expresión es muy baja en ambos; PDX-1 tiende a aumentar con la dieta sin ser significativo esto indica en un proceso de modificación en la expresión diferencial del islote, con BAR-1 se presentó una disminución significativa como se observa en el trabajo de Vilches-Flores (2010).

En un inicio, la dieta aumenta la expresión de las preprohormonas y de los elementos del SEC, excepto el receptor de CB2, lo cual han reportado otros (Kulkarni, 2004) donde también ocurren cambios adaptativos. El tratamiento con BAR-1 sugiere un efecto contrario o que contrarresta los cambios en la expresión. A las ocho semanas, esta respuesta se pierde, o bien es más predominante la influencia crónica de la dieta.

La administración de BAR-1 por vía oral probablemente no permite que se absorba completamente, pero por otro lado, administrar vía cánula implica el riesgo de lesionar al ratón, también está la posibilidad de una administración *ab libitum* por medio del agua del bebedero pero la alta variabilidad de ingesta de organismo a organismo resultaría en una dosificación diferente. Podemos observar que BAR-1 promueve cambios en la expresión

genética de cuatro y ocho semanas donde a cuatro semanas se ve una alta en la expresión de la mayoría de los genes, esto provocado por el estrés de una dieta alta en lípidos y carbohidratos, pero a las ocho semanas solo se ve disminuido, esto puede ser provocado por una adecuación del metabolismo del organismo, donde se busca llegar a una homeostasis; esto es evidente ya que por mucho que se esté estimulando el SEC éste tiene que llegar a un punto de equilibrio.

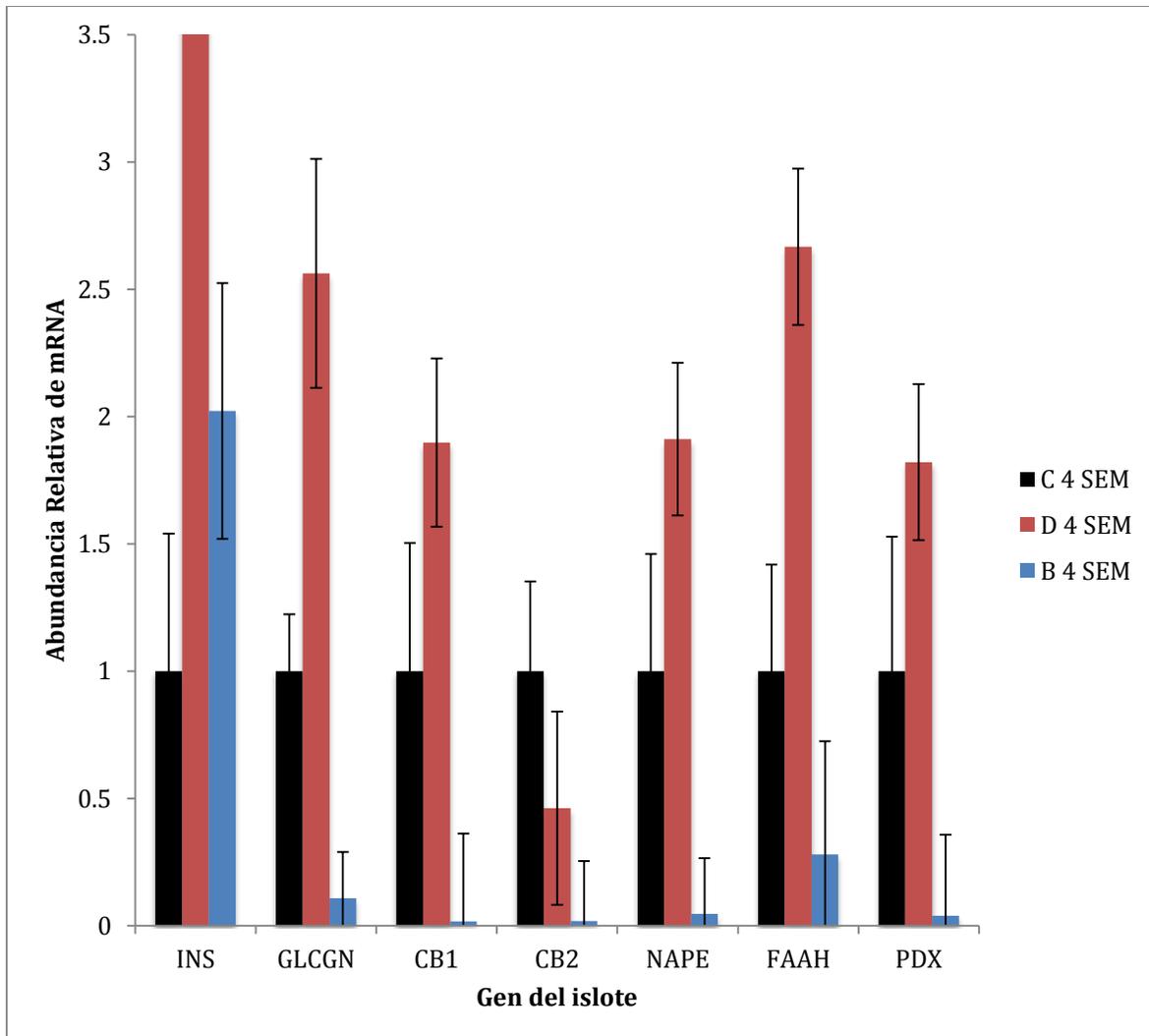


Figura 9 Abundancia relativa de mRNA de preproinsulina (INS), preproglucagon (GLCGN), CB1, CB2 FAAH, NAPE y PDX-1 (veces de incremento, normalizado con 18s) de ratones tratados por cuatro semanas bajo condiciones control (C), dieta hipercalórica (D) y con BAR-1 (B), Datos expresados en valores normalizados con el rRNA 18s. Promedios con error estándar (n=3) (P = 0.05 ANOVA).

En la Figura 10 se aprecia una disminución en la expresión de todos los genes en la condición de dieta con o sin tratamiento de BAR-1; la dieta crónica de ocho semanas basada en aporte de lípidos y carbohidratos en exceso disminuye la expresión de varios genes en el islote pancreático; se observa que los datos del tratamiento a ocho semanas no muestran diferencia entre Dieta y BAR-1 desde los cuadros clínicos hasta en la expresión genética por lo que sería interesante evaluar los efectos de BAR-1 a tiempos más cortos. Cabe resaltar que la extracción de los islotes pancreáticos de los ratones tratados por ocho semanas tuvo mayor dificultad ya que la dieta alta en lípidos hace que se acumule una mayor cantidad de grasa en el páncreas y esto dificulta la extracción de los islotes, posiblemente esto sea causado porque la grasa disminuye la efectividad de la colagenasa que se utiliza para digerir el tejido acinar y dificulta la obtención de islotes por medio del gradiente diferencial.

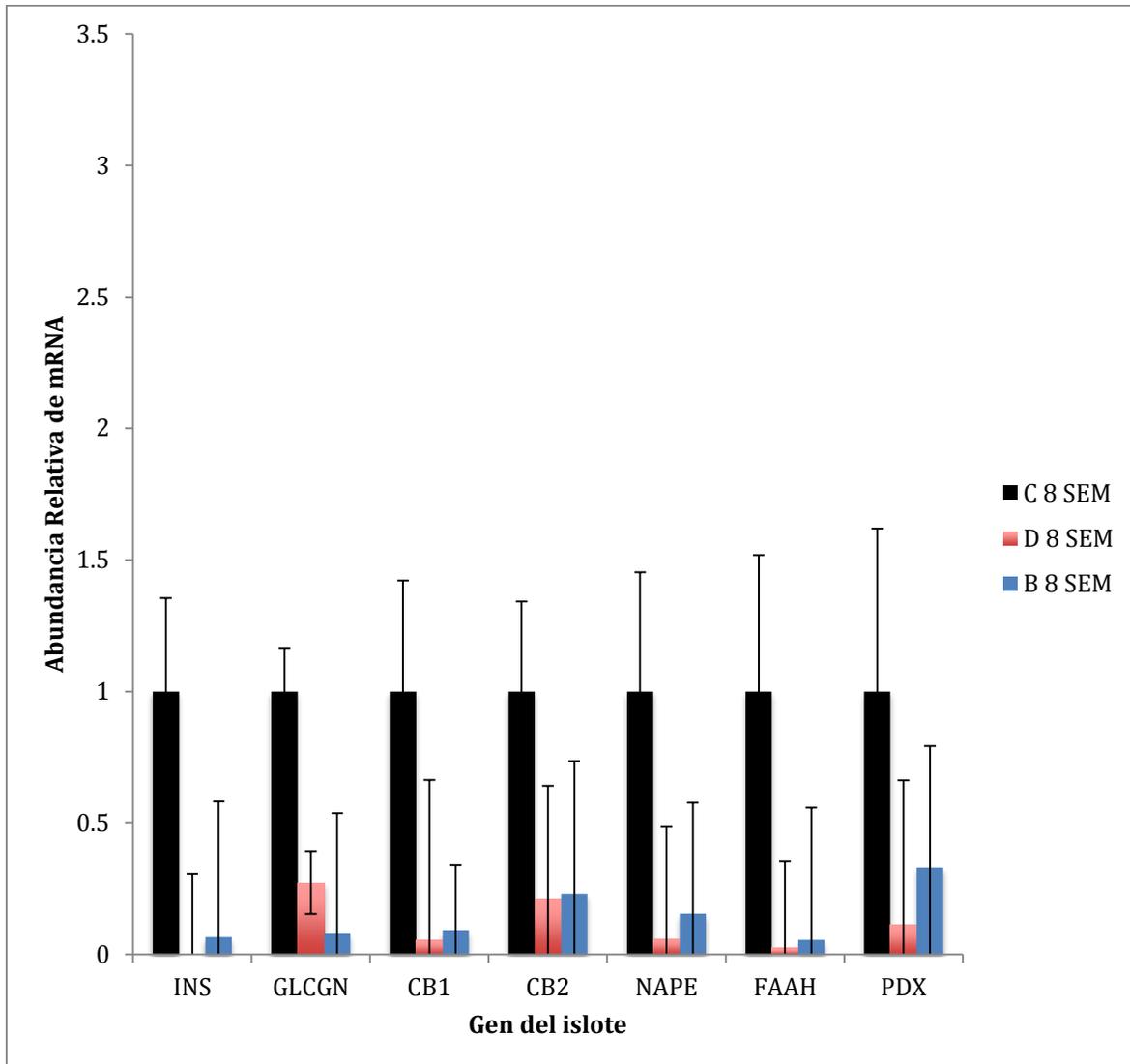


Figura 10 Abundancia relativa de mRNA de preproinsulina (INS), preproglucagon (GLCGN), CB1, CB2 FAAH, NAPE y PDX-1 (veces de incremento, normalizado con 18s) de ratones tratados por ocho semanas bajo condiciones control (C), dieta hipercalórica (D) y con BAR-1 (B), Datos expresados en valores normalizados con el mRNA 18s. Promedios con error estándar (n=3) (P = 0.05 ANOVA).

La Figura 11 muestra la expresión de genes *in vitro* de islotes pancreáticos aislados de ratones sanos, pero se observó que la abundancia de mRNA de preproinsulina aumentó con Rimonabant y disminuyó con HD. Algunas evidencias previas (Banerji y Tiewala, 2006) proponen que el efecto del Rimonabant al bloquear el CB1 decrementa la cantidad de AMPc y por lo tanto la expresión de insulina. Por otro lado, el HD al ser un inhibidor de la FAAH, disminuye la degradación de AEA por lo que no se encuentra el ácido araquidónico en el medio y ya que éste también participa en la secreción de insulina; posiblemente el HD también inhiba o bloquee al CB1 y por lo tanto podría producir la misma respuesta que el Rimonabant (Roa-Coria, 2012). La expresión de mRNA para preproglucagon aporta evidencia de que los elementos del SEC también están presentes en las células alfa, y que su regulación es diferente al de las células beta. NAPE y FAAH son las enzimas involucradas en la síntesis y degradación de AEA, el principal agonista de los receptores CB1 (Bermudez-Silva, 2009). Un exceso de AEA promueve la expresión de glucagon en las células alfa, aunque es baja su afinidad puede que interactúe con CB2 pero para observar esto se requiere de una estrategia de bloqueo con un inhibidor al receptor. Otro punto a evaluar es que el BAR-1 causa cambios a nivel expresión genética pero sin que la célula esté produciendo la proteína. En el caso de insulina se puede cuantificar el contenido de insulina en el islote, y a través de western-blot o inmunofluorescencia, se aportarían evidencias de modificaciones estructurales del islote pancreático.

A la fecha no se ha estudiado sobre la interacción BAR-1 y Rimonabant en los receptores ni en su afinidad, esto se puede corroborar con un estudio de afinidad o de binding con el CB1 ya que también existe la posibilidad de que BAR-1 tenga una afinidad por el CB2.

Estructuralmente se han observado pocos cambios de los islotes pancreáticos pero se ha visto una diferencia entre los grupos experimentales esto aunado a que PDX-1 es un factor de transcripción fundamental para la expresión de muchos elementos propios del islote, para su diferenciación y proliferación (Kaneto y Mastuoka, 2015). Nosotros observamos que los niveles de RNAm de PDX-1 se elevaron a las 4 semanas lo cual podría asociarse con una proliferación de los islotes pancreáticos o un crecimiento de éstos. En el desarrollo del síndrome metabólico, existen también cambios estructurales en islote como resultado de procesos de hiperplasia e hipertrofia de las células (Marchetti *et al.* 2008). Resulta entonces interesante evaluar el futuro los posibles efectos de BAR-1

sobre la organización histológica de los islotes bajo el modelo de síndrome metabólico y en otras condiciones.

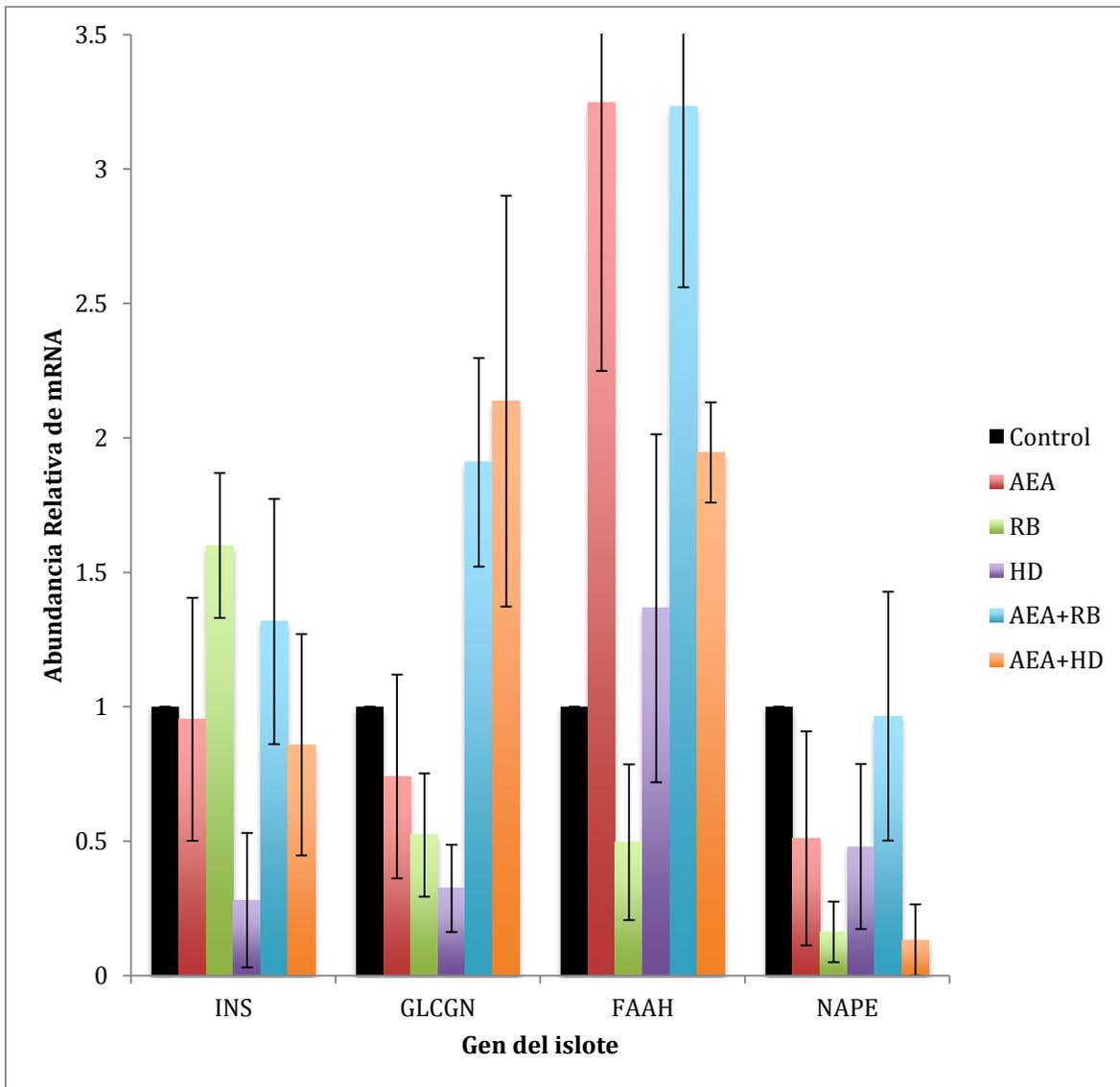


Figura 11. Abundancia relativa de mRNA de preproinsulina (INS), preproglucagon (GLCGN), FAAH y NAPE (veces de incremento, normalizado con 18s) en islotes pancreáticos de ratones sanos cultivados en 5 mM de glucosa y tratados una hora *in vitro* con agonistas y antagonistas sintéticos, valores normalizados con el mRNA 18s. Promedios con error estándar (n=4) (P = 0.05 ANOVA).

La secreción de insulina (Fig. 12) es una forma sencilla de ver el funcionamiento de los islotes pancreáticos, a baja glucosa los islotes tratados con AEA tuvieron una secreción basal similar a los del control, sin embargo no responden a la estimulación con glucosa, los islotes tratados con BAR-1 disminuyeron su secreción basal de insulina pero no muestran cambios en su respuesta, lo que coincide con lo previamente reportado con islotes de rata (Vilches-Flores, *et al.* 2010), pero la AEA aunada al BAR-1 disminuyó significativamente la secreción de insulina casi a la mitad, lo cual no coincide con los resultados obtenidos en rata. Está reportado el efecto del rimonabant de disminuir la resistencia a la insulina mejorando su efecto sin embargo, no promueve su secreción (Banerji y Tiewala, 2006). En islotes de rata está reportado que el rimonabant disminuye la secreción de insulina *in vitro* (Getty-Kaushik, 2009), lo cual coincide con las observaciones en ratón.

Los islotes tratados con HD presentaron un efecto similar al BAR-1, lo que sugiere que la modulación de los receptores CB1 o CB2 en función de la cantidad de AEA presente participa en la respuesta secretora. Ya que, estructuralmente HD es muy similar a la AEA pero sus efectos son parecidos a los del rimonabant (Roa-Coria, 2012), es probable que también reduzca la resistencia a la insulina a través de mejorar su efecto, que en el caso del islote, podría ser promoviendo su efecto autocrino (Leibiger 2001).

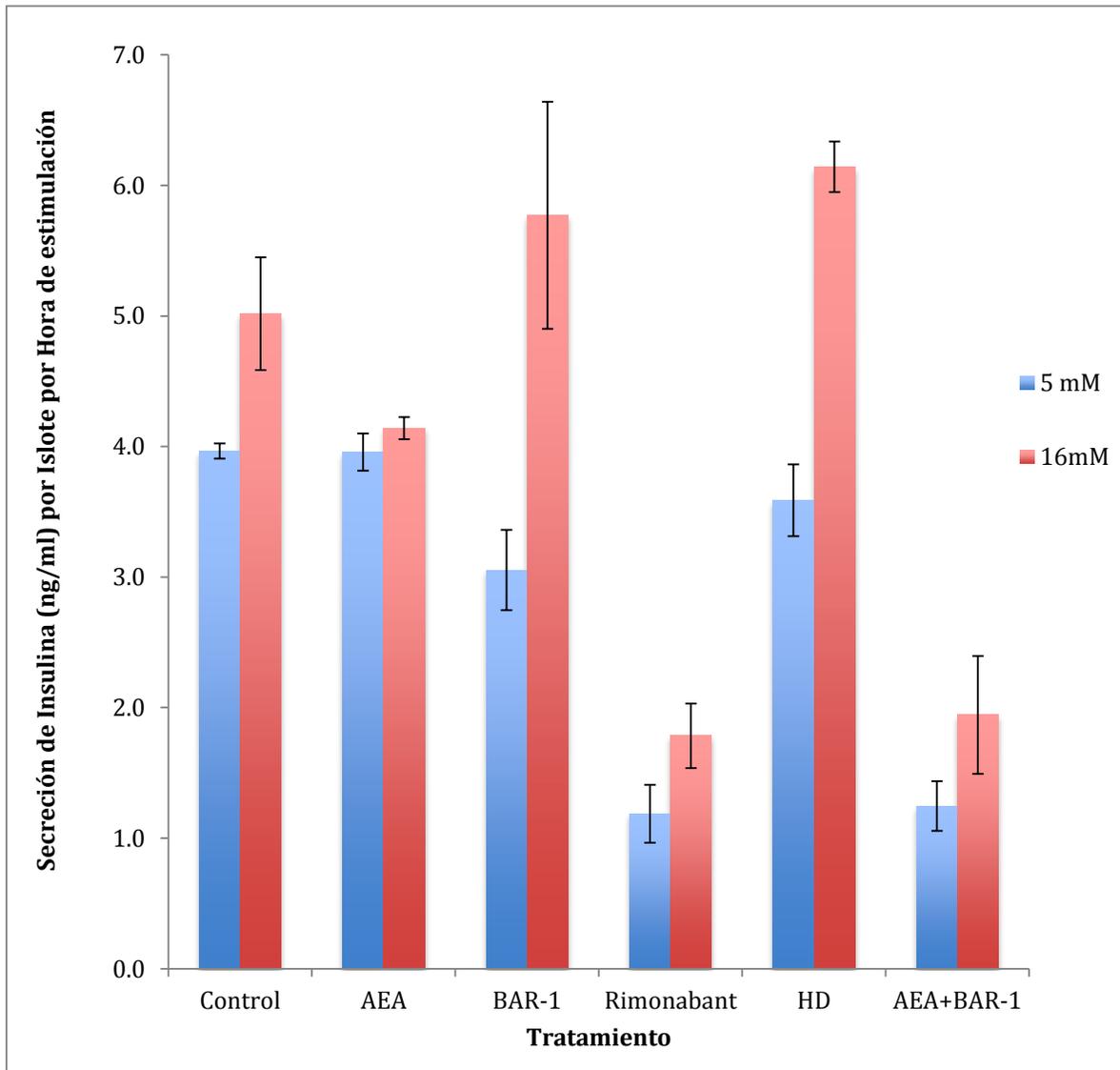


Figura 12. Secreción de Insulina (ng/ml) de islotes pancreáticos aislados de ratón, sometidos a una hora de estimulación a 5 mM y 16 mM de glucosa, promedios con error estándar (n=4) (P = 0.05 ANOVA).

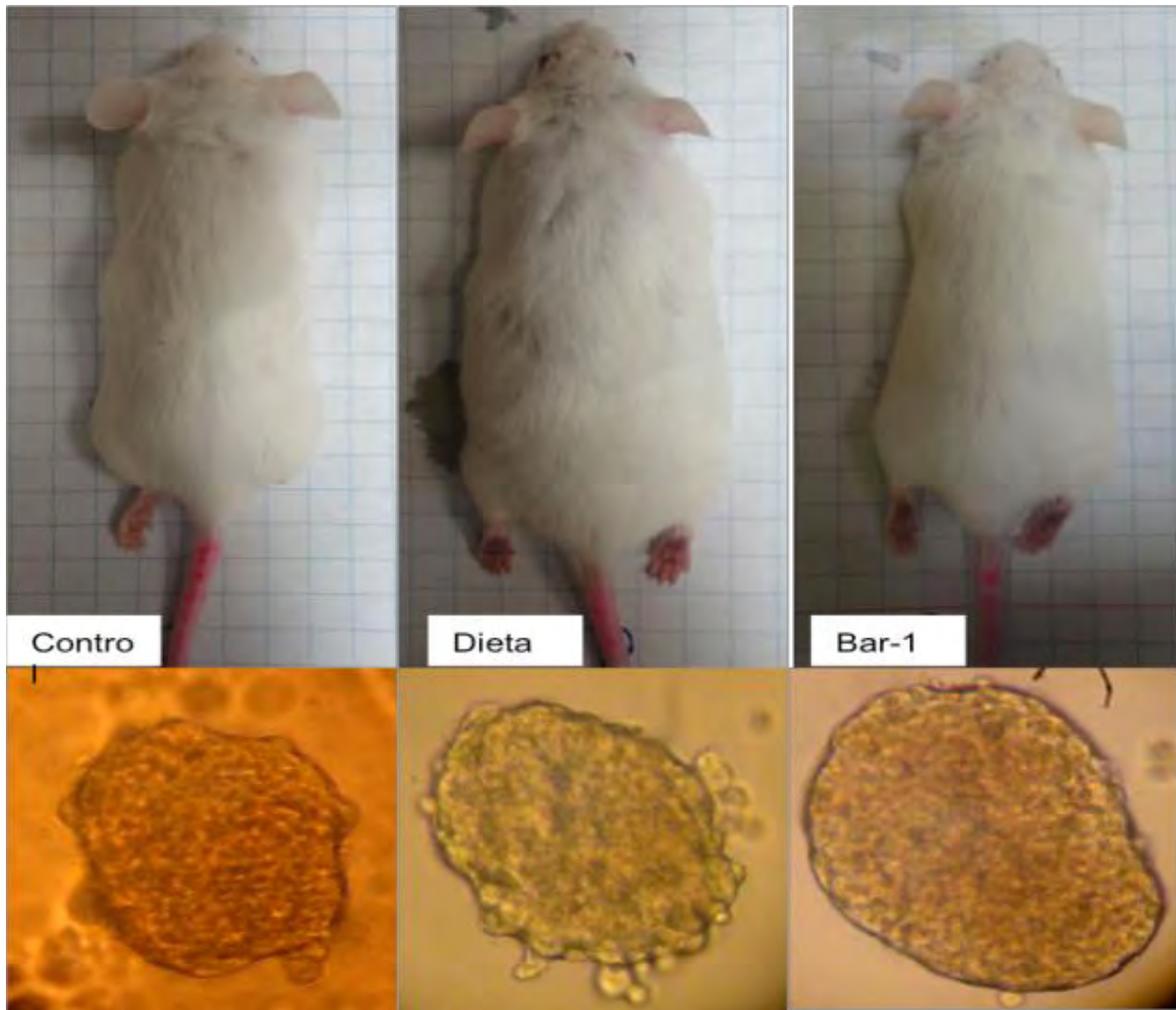


Figura 13.- Fotografía de los ratones de diferentes grupos experimentales a las ocho semanas mostrando una fotografía representativa de un islote pancreático aislado de cada grupo. Amplificación a 40x.

CONCLUSIONES

- La anandamida y los inhibidores sintéticos de FAAH (HD), Rimonabant y BAR-1 modificaron la secreción de insulina estimulada por glucosa, en cultivos primarios de islotes pancreáticos de ratón.
- La expresión genética de preproinsulina y otros genes del islote pancreático, cambió en función de las diferentes condiciones de glucosa, en presencia o ausencia de anandamida, el inhibidor sintético de FAAH (HD), BAR-1 y Rimonabant.
- La secreción de insulina y la expresión genética, de islotes aislados de ratones bajo un modelo de síndrome metabólico no se afectaron por la administración farmacológica de BAR-1.

REFERENCIAS.

- Anderson RL, Randar MD y Chan SLF. 2013. The complex effects of cannabinoids on insulin secretion from rat isolated islets of Langerhans. *Eur. J. Pharmacol.* 706 56–62.
- Arias-Diaz J, Vara E y Balibrea JL. 2001. . Itimos avances en el campo del trasplante de islotes de Langerhans. *Cir. Esp.* 70: 310-313.
- Banerji M, Tiewala M. 2006. Rimonabant The RIO North America trial: a new strategy to sustaining weight loss and related morbidity. *Curr. Diab. Rep.* Jun;6(3): 228-229.
- Bermúdez-Silva FJ, McPartland JM, Rodríguez FF y Paz VM 2009. El sistema endocannabinoide, homeostasis energética y obesidad: ¿el final o un nuevo comienzo? *Rev. Esp. Obes.* 7(6): 342-359.
- Bermudez-Silva FJ, Sanchez-Vera I, Suárez J, Serrano A, Fuentes E, Juan-Pico P, Nadal A, Rodríguez de Fonseca F. 2007. Role of cannabinoid CB2 receptors in glucose homeostasis in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 565: 207–211.
- Brandan NC, Llanos IC, Miño CA y Rodriguez A. 2011. Hormonas pancreaticas. Catedra de Bioquímica Edicion 2011. Universidad Nacional del Nordeste.
- De Gottardi A, Sphar L, Ravier-Dall F y Hadengue A . 2010. Cannabinoid Receptor 1 and 2 Agonist Increase Lipid Accumulation in Hepatocytes. *Liver Int.* 30(10):1482-9
- Duvivier VF, Delafoy-Plasse L, Delion V, Lechevalier P, Le Bail JC, Guillot E, Pruniaux MP, Galzin AM. 2009. Beneficial effect of a chronic treatment with rimonabant on pancreatic function and beta-cell morphology in Zucker Fatty rats. *Eur. J. Pharmacol.* 616 (1-3): 314-20.
- Getty-Kaushik L, Richard AM, Deeney JT, Krawczyk S, Shirihai O, Corkey BE. 2009. The CB1 antagonist rimonabant decreases insulin hypersecretion in rat pancreatic islets. *Obesity* 17(10): 1856-60.
- Grotenhermen F. 2006. Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide. *Cannabinoids* 1(1):10-14 [Versión española].
- Hillard C.J. 2000. Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol. *Prostagl. Lip. Mediat.* 61: 3–18
- Kaneto H, Matsuoka T. 2015. Role of Pancreatic Transcription Factors in Maintenance of Mature β -Cell Function. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 6281-6297.
- Kulkarni NR. 2004 The islets β -cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36: 365–371.
- Leibiger B, Leibiger BI, Moede T, Kemper S, Kulkarni NR, Kahn CR, Moitoso de Vargas L, Berggren PO. Selective Insulin Signaling through A and B Insulin Receptors Regulates

Transcription of Insulin and Glucokinase Genes in Pancreatic β Cells. *Mol. Cell.* 7: 559–570.

Li C, Bowe JE, Huang GC, Amiel SA, Jones PM, Persaud SJ. 2011. Cannabinoid receptor agonists and antagonists stimulate insulin secretion from isolated human islets of Langerhans. *Diab. Obes. Metab.* 13(10): 903-10.

Li C, Bowe JE, Jones PM, Persaud SJ. 2010. Expression and function of cannabinoid receptors in mouse islets. *Islets* 2(5): 293-302.

Li C, Jones MP, Persaud JS. 2011. Role of the endocannabinoid system in food intake, energy homeostasis and regulation of the endocrine pancreas. *Pharm. Therap.* 129(3): 307–20.

Li C, Vilches-Flores A, Zhao M, Amiel SA, Jones PM, Persaud SJ. 2012. Expression and function of monoacylglycerol lipase in mouse β -cells and human islets of Langerhans. *Cell Physiol Biochem.* 30(2): 347-58.

Lipina C, Rastedt W, Andrew JI, y Hundal HS. 2012. New vistas for treatment of obesity and diabetes? Endocannabinoid signalling and metabolism in the modulation of energy balance. *Bioessays* 34(8): 681-91

Livak K, Schmittgen T. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2⁻DDCT Method. *METHODS* 25, 402–408.

Marchetti P, Dotta F, Lauro F y Purrello F. 2008. An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: Implications for treatment. *Reg. Pept.* 146: 4–11

Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo L. 2006. Regulation, Function, and Dysregulation of Endocannabinoids in Models of Adipose and B - Pancreatic Cells and in Obesity and Hyperglycemia. *J. Clin. Endo. Met.* 91(8):3171–3180.

Matias I, Gonthier MP, Petrosino S, Docimo L, Capasso R, Hoareau L, Monteleone P, Roche R, Izzo AA, Di Marzo V. 2007. Role and regulation of acylethanolamides in energy balance: focus on adipocytes and beta-cells. *Br. J. Pharmacol.* 152(5): 676-690.

McLaughlin PJ. 2012. Reports of the death of CB1 antagonists have been greatly exaggerated: recent preclinical findings predict improved safety in the treatment of obesity. *Behav Pharmacol* 23(5-6): 537-50.

Netzahualcoyotzi-Piedra C, Muñoz-Arenas G, Martínez-García I, Florán-Garduño B, Limón-Pérez de León ID, 2009, La marihuana y el sistema endocanabinoide: De sus efectos recreativos a la terapéutica. *Rev. Biomed.* 20: 128-153

Roa-Coria JE. 2012. N-(4-Methoxy-2-nitrophenyl) hexadecanamide, a palmitoylethanol amide analogue, reduces formalin-induced nociception. *Life Sci.* 91(25-26): 1288-94.

Rodriguez U, Carrillo E, Soto E. 2005. Cannabinoides: Neurobiología y sus usos médicos. *Elementos* 60: 3-9.

Saltiel RL, Kahn RC. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806.

Scheen A.J, Finer N, Hollander P, Jensen M.D, Van Gaal L.F. 2006. Efficient and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomized controlled study. *Lancet* 368: 1660-1672

Starowicz KM, Cristino L, Matias I, Capasso R, Racioppi A, Izzo AA, Di Marzo V. 2008, Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity* 16(3): 553-65.

Vilches-Flores A, Delgado-Buenrostro NL, Navarrete-Vázquez G, Villalobos-Molina R. 2010. CB1 cannabinoid receptor expression is regulated by glucose and feeding in rat pancreatic islets. *Reg. Pept.* 163:81-87.

Vilches-Flores A, Hauge-Evans A, Jones P, Persaud S. 2013. Chronic activation of cannabinoid receptors in vitro does not compromise mouse islet function. *Clin. Sci, (Lond)* 124(7): 467-78.