

# Incretinas y la Regulación del Metabolismo Energético

TRABAJO FIN DE GRADO  
FACULTAD DE FARMACIA  
Curso académico 2021-2022

Estudiante: Ainhoa Díaz Trujillo

Tutores: Dr. Guadalberto Hernández  
Dra. Silvia Velázquez García

La Dra. Silvia Velázquez García y el Dr. Guadalberto Hernández,

**CERTIFICAN**

- Que el Trabajo Fin de Grado (TFG) Titulado "Incretinas y la Regulación del Metabolismo Energético", ha sido realizado, bajo nuestra supervisión, por la estudiante de Grado en Farmacia por la ULL Ainhoa Díaz Trujillo, durante el curso académico 2021-2022.
- Que revisada la memoria del TFG, expresamos nuestro consentimiento para su lectura y defensa ante el Tribunal que se designe por la Facultad de Farmacia de la ULL.

Para que conste, en La Laguna 3 de marzo de 2023.



**Dra. Silvia Velázquez.**



**Dr. Guadalberto Hernández.**

## Índice

Resumen .....	4
Abstract .....	5
Abreviaturas .....	6
1. Introducción .....	7
1.1 Metabolismo energético .....	7
1.2 El páncreas .....	8
1.3 Diabetes Mellitus tipo 2 .....	13
1.4 Incretinas.....	14
2. Hipótesis .....	18
3. Objetivos.....	19
4. Material y Métodos .....	19
4.1 Búsqueda bibliográfica.....	19
4.2 Diseño Experimental .....	20
5. Conclusiones .....	23
6. Bibliografía.....	24

## Resumen

Las incretinas son hormonas intestinales secretadas en respuesta a la ingesta de alimentos. Estas hormonas son utilizadas como tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2), ya que sus funciones son insulínótropas. El péptido similar al Glucagón-1 (GLP-1) y el Polipéptido Insulínótropo Dependiente de Glucosa (GIP), son dos de las incretinas con mayor potencia en sus efectos. El GLP-1 es capaz de inhibir la secreción de glucagón, retrasar el vaciamiento gástrico, aumentar la saciedad y disminuir las concentraciones de ácidos grasos libres. El GIP además de las funciones similares al GLP-1 inhibe la secreción de ácido clorhídrico en el estómago. Específicamente, para el tratamiento de la DMT2 se han propuesto fármacos agonistas de GLP-1 e inhibidores de la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DPP4) por su acción metabolizante de GLP-1 y GIP. En este TFG de carácter bibliográfico, se propone un diseño experimental en un modelo murino para estudiar la posible acción preventiva de los fármacos mencionados sobre la DMT2 en individuos obesos. El diseño implica a ratones C57BL/6 como población control (Wild Type, WT) y las cepas  $Lepr^{db/db}$  y  $Lep^{ob/ob}$  como modelos de enfermedad, tratados durante 5 semanas con vehículo (NaCl 0,9%), o con un agonista de GLP-1 (Exenatida), o con un inhibidor de la DPP4, (Sitagliptina). Las variables a determinar en los grupos experimentales son: peso corporal, composición corporal, glucemia, tolerancia a la glucosa (GTT), insulinemia, tolerancia a la insulina (ITT) y concentraciones plasmáticas de incretinas.

**Palabras clave:** Incretinas, Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2), Péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), Polipéptido insulínótropo dependiente de glucosa (GIP), Resistencia a la insulina, Modelo murino.

## **Abstract**

Incretins are gut hormones secreted in response to food intake. These hormones are used as a treatment for Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), as their functions are insulinotropic. We will focus on two of them which are the most potent, glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP). GLP-1 can inhibit glucagon secretion, delay gastric emptying, increase satiety and decrease free fatty acid concentrations. GIP, in addition to GLP-1-like functions, also inhibits the secretion of hydrochloric acid in the stomach. GLP-1 agonist drugs and dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) inhibitors have been proposed for the treatment of T2DM. Following the literature review, we propose an experimental design using a murine model in order to evaluate preventive actions in obese individuals of drugs mentioned above for T2DM. Our design implies to WT (Wild Type) C57BL/6 mice as control population and  $Lepr^{db/db}$  and  $Lep^{ob/ob}$  mice as disease models, treated during 5 weeks with vehicle (NaCl 0.9%) or a GLP-1 agonist (Exenatide), or a DPP4 inhibitor (Sitagliptin). The biological variables to determine in each experimental group are: body weight, body composition, glycaemia, glucose tolerance (GTT), insulinemia, insulin tolerance (ITT) and plasmatic/seric incretin concentration.

**Key words:** Incretins, Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), Glucagon-like peptide-1 (GLP-1), Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP), Insulin resistance, Murine model.

## Abreviaturas

AAs: Aminoácidos.

Acetil-CoA: Acetil coenzima A.

ADA: American Diabetes Association.

AKT: Proteína serina-treonina cinasa.

ARNm: ARN mensajero.

ATP: Trifosfato de adenosina.

cAMP: Adenosín monofosfato cíclico.

CMO: Contenido mineral óseo.

DMO: Densidad mineral ósea.

DMT2: Diabetes mellitus tipo 2.

DPP4: Dipeptidil peptidasa 4.

EASD: European Association for the Study of Diabetes.

FDA: Food and Drug Administration

GIP: Polipéptido insulínico dependiente de glucosa.

GIPR: Receptor del polipéptido insulínico dependiente de glucosa.

GLP-1: Péptido similar al glucagón-1.

GLUT: Transportador de glucosa unido a membrana.

GLUT4: Transportador de glucosa tipo 4.

GTT: Tolerancia a la glucosa.

IMC: Índice de masa corporal.

IR: Receptor de insulina.

IRS: Sustrato del receptor de insulina.

ITT: Tolerancia a la insulina.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

PI3K: Fosfatidilinositol-3-cinasa.

PKB: Proteína quinasa B.

PM: Peso molecular.

PP: Polipéptido pancreático.

Ser: Serina.

Thr: Treonina.

Tyr: Tirosina.

WT: Wild Type.

# 1. Introducción

## 1.1 Metabolismo energético

Las células del cuerpo humano obtienen la energía metabólica a partir de los alimentos que consumimos, utilizando los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas como fuente para obtener (ATP), dependiendo de que la ruta metabólica sea aeróbica o anaeróbica. Así, los hidratos de carbono se transforman en glucosa en el aparato digestivo y el hígado, las proteínas se convierten en aminoácidos y las grasas en ácidos grasos.

En el interior celular, la mitocondria cataliza las distintas reacciones enzimáticas que rinden el ATP que será utilizado como soporte energético de funciones celulares tales como el transporte de sustancias, la síntesis de compuestos químicos o la movilidad celular.

En la figura 1 se muestran las reacciones biológicas por las cuales se obtiene el ATP destacando la combustión de hidratos de carbono, principalmente la glucosa, y la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (1). El exceso de glucosa se convierte, vía glucogénesis hepática, en glucógeno. Cuando se necesita glucosa como fuente de energía se degrada glucógeno por la glucogenolisis. La glucosa se convierte en ribosa 5 fosfato (un componente de los nucleótidos) y NADPH (un poderoso agente reductor) por la vía de las pentosas fosfato. La glucosa, por la glucólisis, se convierte en piruvato. En presencia de oxígeno, el piruvato se transformará en Acetil-CoA (Acetil-CoA) que entrará en el ciclo de Krebs (ciclo de ácidos tricarboxílicos) para obtener concentraciones diferentes de ATP dependiendo de que se realice en condiciones aeróbicas (36 ATP) o anaeróbicas (2 ATP). Las rutas metabólicas están relacionadas entre sí. Así, los ácidos grasos contribuirán a la obtención de ATP, siempre en condiciones aeróbicas cuando el aporte calórico es deficitario, mientras que se sintetizarán y acumularán como grasa en la situación calórica opuesta. Por último, aunque la degradación de aminoácidos podría contribuir a la obtención de energía metabólica en situaciones de ayuno prolongado o aporte alimenticio severamente bajo, la importancia de las funciones proteicas (estructurales y reguladoras) hace que, en condiciones

fisiológicas, las rutas metabólicas están fundamentalmente orientadas a la síntesis proteica (2).

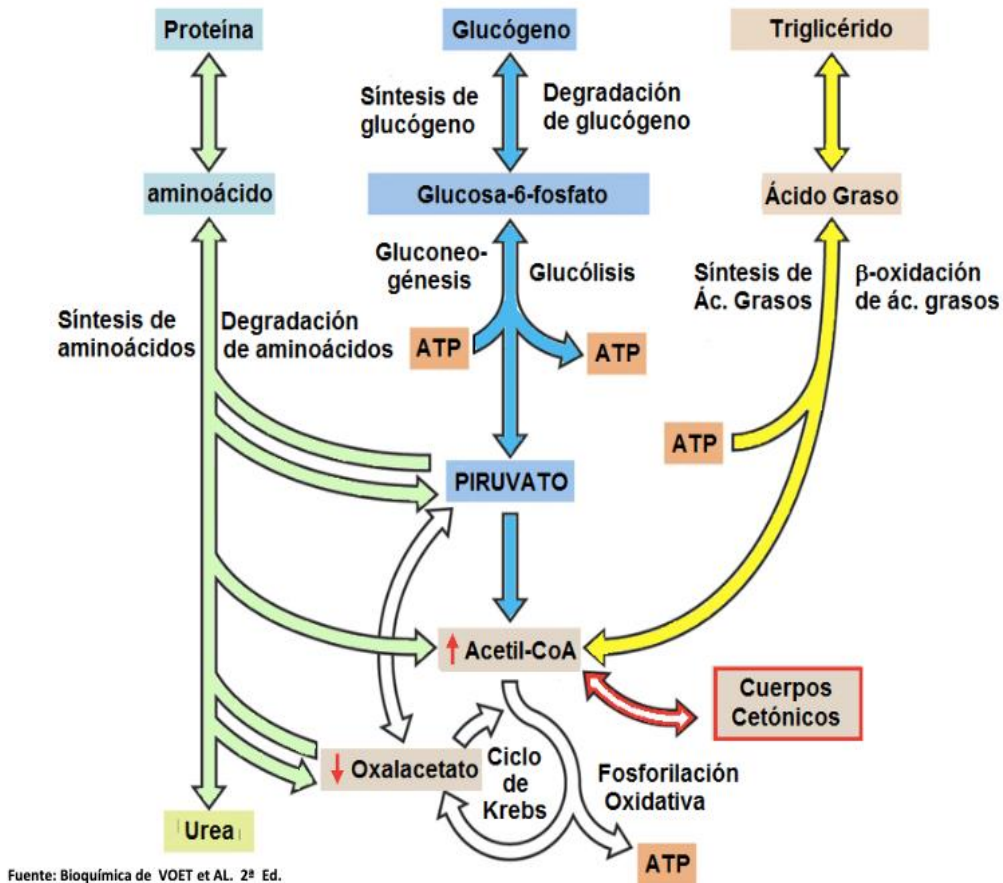


Figura 1. Metabolismo intermediario. [Imagen extraída de (3)]

## 1.2 El páncreas

El páncreas es una glándula mixta pues tiene actividad exocrina y endocrina. Se localiza en el interior de la cavidad abdominal, extendiéndose lateralmente del duodeno hacia el bazo. Es un órgano de forma alargada que en el humano adulto mide entre 20 y 25 cm y pesa unos 80 gramos (4).

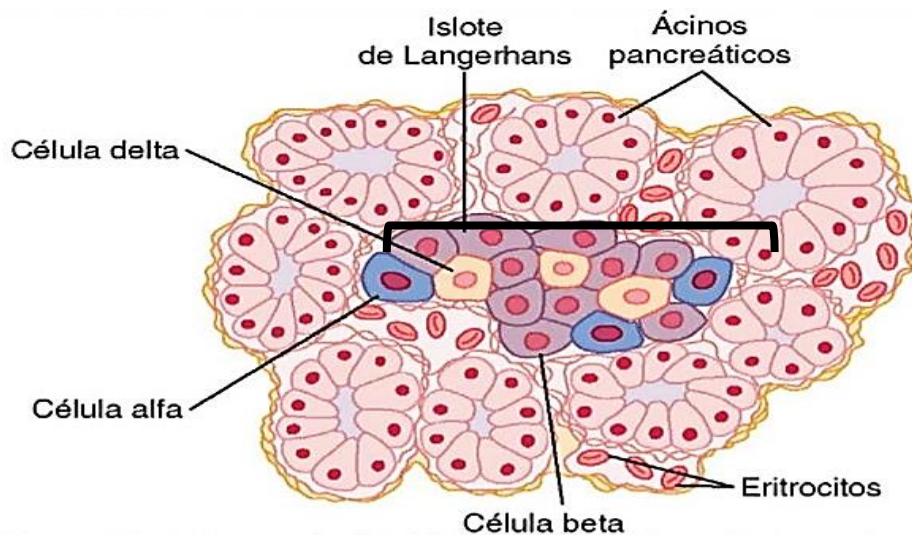
La porción exocrina del páncreas es el 98-99% del volumen total del órgano y está constituida por los acinos pancreáticos, que secretan agua, iones y enzimas al intestino delgado, resultando imprescindible para la regulación de la fisiología digestiva. Aunque el páncreas endocrino representa sólo el 1-2% de la masa total, cumple funciones esenciales en la regulación homeostática del metabolismo intermediario. Los islotes de Langerhans están compuestos por células alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), delta ( $\delta$ ), F (conocidas también como PP) y las



células épsilon ( $\epsilon$ ) que sintetizan y secretan glucagón, insulina, somatostatina, polipéptido pancreático y grelina, respectivamente (5).

### Síntesis y secreción de insulina

Las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans constituyen en humanos el 50-70% de la población de las células totales del páncreas endocrino (6) con posición central, rodeadas por las células  $\alpha$  y las  $\delta$ .



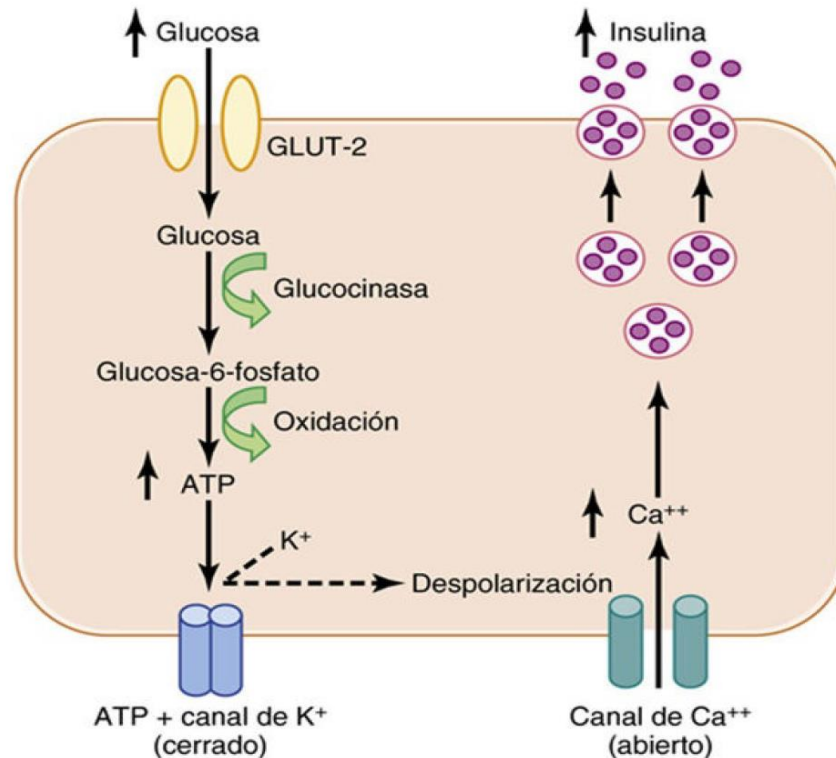
**Figura 2. Anatomía fisiológica de un islote de Langerhans humano. [Imagen extraída de (1)].**

*(Nota: No se muestran las células F y  $\epsilon$ )*

Las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans constituyen en humanos el 50-70% de la población de las células totales del páncreas endocrino (6) con posición central, rodeadas por las células  $\alpha$  y las  $\delta$ .

La función de las células  $\beta$  pancreáticas es sintetizar y liberar insulina en respuesta a incrementos en las concentraciones plasmáticas de glucosa. Una vez que dicho incremento se produce, el transportador de glucosa unido a membrana (GLUT) introduce la glucosa en las células mediante un mecanismo de difusión facilitada. En el citoplasma de las células  $\beta$  la glucosa es fosforilada por la enzima Glucosa 6 fosfato quinasa que, a diferencia de otras hexoquinasas, solo responde a altas concentraciones de glucosa, ingresando en las rutas metabólicas glucolíticas que rendirán finalmente Acetil-CoA y ATP. El aumento de ATP inhibe los canales de potasio sensibles a ATP,

despolarizando la membrana celular. Esta despolarización activa canales de calcio dependientes de voltaje ( $\text{Ca}^{2+}$ ) aumentando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, señal que desencadena la liberación de insulina al torrente sanguíneo por exocitosis.

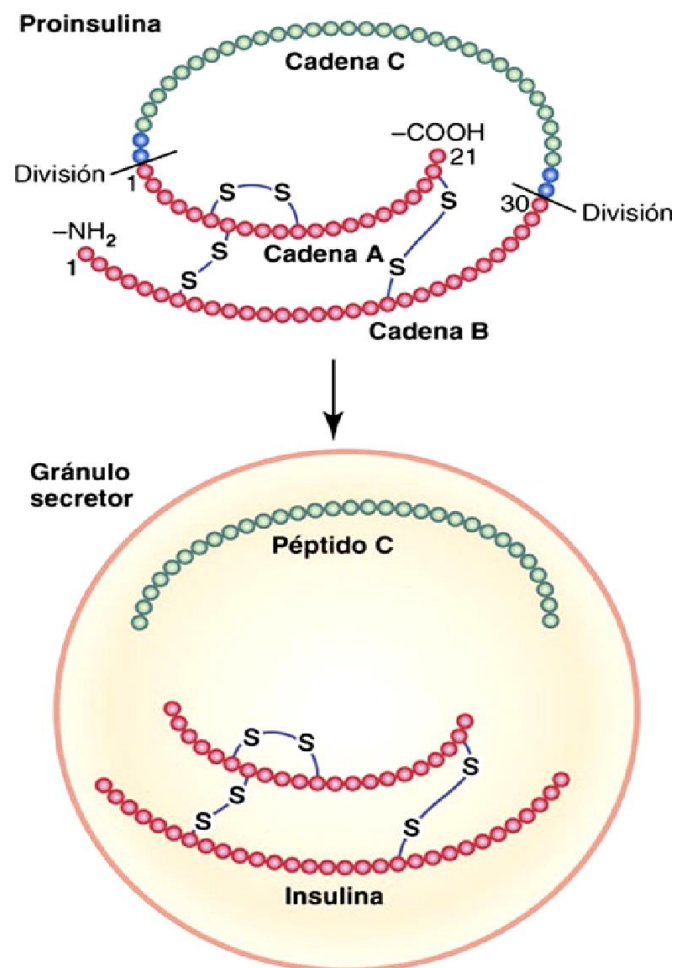


**Figura 3. Mecanismos básicos de la secreción de insulina en las células  $\beta$  del páncreas. [Imagen extraída de (1)].**

La secreción de insulina también puede ser estimulada por las incretinas, hormonas de origen intestinal cuyas características abordaremos más adelante.

La insulina humana con un peso molecular (PM) de 5.808 daltons, está compuesta por dos cadenas de aminoácidos (la cadena A con 21 AAs y la B con 31 AAs), unidas por dos puentes disulfuro entre los aminoácidos cisteína, en la posición 7 de las cadenas A y B, respectivamente, y entre las posiciones 20 A y 19 B. También existe un enlace intracatenario entre los residuos 6 y 11 de la cadena A (Figura 4). La síntesis está codificada en un sólo gen del cromosoma 11, de donde se obtiene el ARNm maduro que sirve de molde para la preproinsulina (de 110 AAs y 11.500 daltons de PM), la cual se transforma en la proinsulina en el retículo sarcoplasmático, molécula de 9000 daltons de PM constituida por tres cadenas peptídicas (A, B y C -o péptido de conexión-).

Por último, en el Aparato de Golgi, incorporando los enlaces S-S, y perdiendo el péptido C, da lugar a la insulina madura (1) (5) (Figura 4).

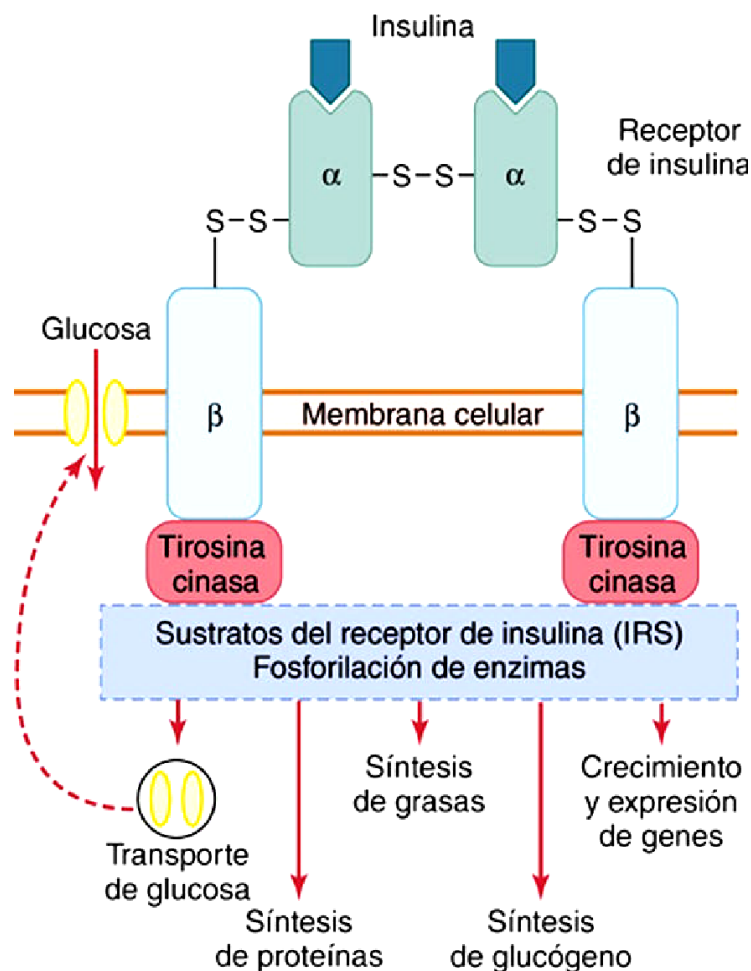


**Figura 4. Esquema de la molécula proinsulina humana de la que se escinde el péptido C para formar la insulina. [Imagen extraída de (1)].**

La mayor parte de la insulina liberada al torrente sanguíneo circula de forma libre, esto es, no unida a proteínas plasmáticas transportadoras, siendo su vida media de aproximadamente 6 minutos (1).

La insulina ejerce su función tras unión a su receptor (IR) que, perteneciendo a la familia de receptores tirosin-quinasa, tiene cuatro subunidades: dos alfa y dos beta, unidas entre sí por puentes disulfuro (7). En la subunidad alfa (totalmente extracelular) se localiza el sitio de unión para la insulina. La subunidad beta, que tiene una porción extracelular unida a la alfa por puentes disulfuro, presenta actividad tirosin-quinasa en su dominio intracelular activándose mediante fosforilación cuando la insulina se une a la subunidad alfa. Una vez unida a la subunidad alfa, la insulina sufre un cambio

conformacional que permite la activación de la subunidad beta, activando una tirosina quinasa local que fosforila a muchas otras, entre ellas el sustrato del receptor de insulina (IRS) (1) (Figura 5). El IRS desencadena las cascadas de señalización intracelular activando dos vías principales: a vía de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/AKT y la vía de las quinasas activadas por mitógeno/RAS (MAPK/Ras) (8). La vía PI3K/AKT desempeña un papel fundamental en la señalización de la insulina, ya que su activación condiciona la fosforilación de sustratos con funciones clave en procesos biológicos, como activación de enzimas y/o factores de transcripción, proteínas reguladoras del ciclo celular o proteínas de apoptosis y de supervivencia. Por otra parte, las acciones de la insulina como factor de crecimiento y regulador de la expresión génica y/o sus efectos mitógenos son mediados mediante la activación de la vía de las MAPK/Ras (8).



**Figura 5. Esquema receptor de insulina y de su mecanismo de acción. [Imagen extraída de (1)].**

## Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina es un estado fisiopatológico que provoca la ausencia de la respuesta biológica de muchos tejidos corporales a concentraciones plasmáticas de la hormona dentro de límites normales que aumenta la predisposición a desarrollar Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2), así como otros desórdenes de salud entre los que se encuentran la obesidad, la hipertensión o las enfermedades cardiovasculares. Existen diferentes alteraciones fisiopatológicas por las que se desarrolla la resistencia a la insulina, siendo las más comunes:

- A. disminución en el número de receptores y de su actividad quinasa;
- B. aumento en la fosforilación de los residuos de serina y treonina del receptor de insulina y de IRS;
- C. disminución de la actividad de las quinasas PI3K y AKT;
- D. defectos en la expresión y la función del transportador de glucosa GLUT4 (7).

### **1.3 Diabetes Mellitus tipo 2**

La DMT2 (anteriormente conocida como no insulino dependiente) es la más frecuente de las diabetes, presentándola más del 95% de las personas que desarrollan esta enfermedad. Generalmente aparece en adultos, aunque en la actualidad ha aumentado en personas jóvenes. Su etiología no se conoce con exactitud, proponiéndose como una enfermedad multifactorial, siendo la obesidad, el sobrepeso y/o el sedentarismo factores importantes en su aparición.

La respuesta a los carbohidratos ingeridos es diferente en individuos sanos con un metabolismo de la glucosa normal en comparación con aquellos que presentan DMT2. El primer estado de la enfermedad se conoce como prediabetes, caracterizado por grandes hiperglucemias, condicionado por apoptosis de las células beta de los islotes de Langerhans (9).

## Tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2

El tratamiento de la DMT2 se inicia con ejercicio físico y terapia nutricional (dietas hipocalóricas). Además, la American Diabetes Association (ADA) y la European Association for the Study of Diabetes (EASD) recomienda añadir metformina desde el comienzo de la enfermedad por sus efectos beneficiosos sobre el control glucémico y el peso, que se añaden a su bajo coste y a los pocos efectos secundarios. Sin embargo, el tratamiento con hipoglucemiantes orales en monoterapia o en combinación, aunque inicialmente son eficaces suelen ser insuficientes con el tiempo, teniendo que incorporar el tratamiento con insulina para regular la glucemia (10).

La metformina, una biguanida que disminuye las concentraciones plasmáticas altas de glucosa, tanto basales como postprandiales, actúa como antihiperglucemiante más que como hipoglucemiante. Se desconoce su mecanismo de acción exacto, si bien parece aumentar la sensibilidad de tejidos periféricos a la acción de insulina. En el hígado disminuye la producción de glucosa por inhibición de la glucogenolisis y de la gluconeogénesis. Además, favorece el almacenamiento de la glucosa como glucógeno por la estimulación de la glucógeno sintetasa (11). Recientemente, se ha postulado la administración de fármacos con actividad incretina, en terapia combinada con otros antidiabéticos orales, especialmente con la metformina cuando ésta no sea suficiente.

### **1.4 Incretinas**

Otros factores que estimulan la secreción moderada de insulina son las hormonas gastrointestinales como la gastrina, la secretina, la colecistocinina, el péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) y el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP). A estas dos últimas hormonas se les denomina incretinas.

Las incretinas son hormonas que intervienen en la regulación de la secreción de insulina secretadas en el estómago y el intestino en respuesta a la ingesta de alimentos. El término “incretina” en la década de 1920 (12), refiriéndose a ellas como hormonas de origen gastrointestinal, que son liberadas como consecuencia de la ingesta calórica. En 1964 se descubrió el

llamado “efecto incretina” porque al administrar una dosis de glucosa por vía oral se inducía una mayor liberación de insulina que la provocada por la misma dosis de glucosa administrada por vía endovenosa (13).

Como los efectos de GLP-1 y de GIP son los más potentes, han recibido atención como potenciales sustancias válidas para el tratamiento de la DMT2. También ejercen otro tipo de funciones: el GLP-1 puede inhibir la secreción de glucagón, retrasar el vaciamiento gástrico, aumentar la saciedad, disminuir las concentraciones de ácidos grasos libres y disminuir el peso corporal, y el GIP aparte de presentar funciones similares al GLP-1, inhibe la secreción de ácido clorhídrico en el estómago (10).

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

GLP-1 es un producto de escisión del gen proglucagón que cuenta con 30 aminoácidos, descubierto en el año 1985 como un potente factor insulínico. Es secretado por células de la mucosa intestinal, denominadas células L, que se encuentran en el intestino delgado distal y en el colon (14). Se secreta tras el estímulo de nutrientes como los carbohidratos y las grasas, pero rápidamente es degradado por la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DPP4), llegando a la circulación sistémica un 10-15% del producto secretado inicial, siendo su semivida plasmática de aproximadamente 2 minutos (10).

- Polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP)

El GIP es la primera incretina aislada y su estructura fue definida en 1971 por John C. Brown (14). Es un péptido de 42 aminoácidos secretado por las células K, localizadas en el duodeno y el yeyuno. Los niveles de GIP son bajos en relación con los niveles que se alcanzan tras una comida. La liberación de GIP es estimulada por alimentos que contengan grasas o carbohidratos. El GIP consigue sus efectos insulínicos al unirse a su receptor específico (GIPR), que está acoplado a aumentos en los niveles intracelulares de cAMP y  $Ca^{2+}$  en las células  $\beta$  del páncreas (13). Esta cascada de señales intracelulares provoca una rápida exocitosis de insulina previamente sintetizada y contenida en los gránulos secretorios del citosol (12).

	Concentración plasmática		T vida media
	Ayuno	Postprandial	
GIP	9-11 pM	50-120 pM	5-7 min
GLP-1	5-10 pM	15-30 pM	1-2 min

**Tabla 1. Vida media (14) y concentraciones de GIP y GLP-1 en ayuno y postprandial (10).**

En la Diabetes Mellitus tipo 2 existe un moderado grado de hiposecreción de GLP-1, manteniéndose en gran parte el efecto insulínico. Por el contrario, el GIP es secretado de forma normal o aumentada, estando disminuido su efecto insulínico (10).

Por el efecto insulínico de las incretinas, se han planteado como terapia de la DMT2. Factores a favor de esta posibilidad son la corta vida media (menor en el caso del GLP-1) y el aumento de la secreción postprandial (mayor la de GIP). Las posibilidades que se han propuesto son el agonismo del receptor de GLP-1, y la inhibición de la enzima DPP4 (10).

En la tabla 2 se muestran datos respecto a la administración por vía subcutánea de fármacos agonistas de GLP-1 cuyo uso está aprobado en humanos para el tratamiento de la hiperglicemia.



<b>Acción corta</b>		
<b>Exenatida (Byetta®)</b>	Tmax	2h
	T1/2	4h
	Dosificación	2 veces al día
<hr/>		
<b>Lixisenatida (Lyxumia®)</b>	Tmax	1-3,5h
	T1/2	3h
	Dosificación	1 vez al día
<b>Acción intermedia</b>		
<b>Liraglutida (Victoza® y Saxenda®)</b>	Tmax	2h
	T1/2	13h
	Dosificación	1 vez al día
<b>Acción prolongada</b>		
<b>Exenatida (Bydureon®)</b>	Tmax	2h
	T1/2	4h
	Dosificación	1 vez por semana
<hr/>		
<b>Dulaglutida (Trulicity®)</b>	Tmax	1-3 días
	T1/2	5 días
	Dosificación	1 vez por semana
<hr/>		
<b>Semaglutida (Ozempic®)</b>	Tmax	1-3 días
	T1/2	1 semana
	Dosificación	1 vez por semana

**Tabla 2. Fármacos agonistas de GLP-1 de administración por vía subcutánea. Se muestra el tiempo necesario para alcanzar su concentración máxima, el tiempo de vida media y la frecuencia de dosificación (11).**

El uso de algunos fármacos denominados agonistas de GLP-1 está actualmente en controversia, debido a su uso incorrecto para el control de peso corporal en humanos. Así, la Semaglutida (Ozempic®), con efectos beneficiosos en el tratamiento de la obesidad en humanos, según estudios recientes (26), ha llegado al desabastecimiento a finales de 2022. Semaglutida reduce la preferencia por los alimentos ricos en grasa, y reduce la ingesta calórica, que implica disminución del apetito, reduciendo de este modo el peso corporal y la masa grasa corporal (26).

A pesar de la eficacia para el control de la obesidad, existen efectos adversos, como complicaciones de la retinopatía diabética, pancreatitis aguda, reacciones alérgicas graves, náuseas, diarreas, vómitos e hipoglucemia (27).

Además, en estudios realizados con roedores aumentó el riesgo de desarrollar tumores tiroideos, no existiendo datos sobre su capacidad tumorigénica en humanos (28). En EE. UU., la FDA sí aprobó en 2021 la inyección Semaglutida 2,4 mg (Wegovy®) para el control de peso en adultos con obesidad o sobrepeso con alguna otra complicación relacionada con el mismo (hipertensión arterial, DMT2) (29).

Igualmente, el único agonista de GLP-1 aprobado en España para tratar la obesidad es la Liraglutida (Saxenda®). Está indicado combinado con una dieta baja en calorías y aumento de la actividad física, para controlar el peso en pacientes adultos con un Índice de Masa Corporal (IMC)  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> (obesidad) o  $\geq 27$  kg/m<sup>2</sup> (sobrepeso) que presenten al menos una comorbilidad (prediabetes, hipertensión, dislipidemia o apnea obstructiva del sueño) (30).

En la siguiente tabla se muestran datos referidos a fármacos inhibidores de DPP4 cuyo uso está aprobado en humanos para el tratamiento de la hiperglicemia.

<b>Inhibidores DPP4 vía oral</b>		
<b>Vildagliptina (Jalra®)</b>	Tmax	1,7h
	T1/2	3h
	Dosificación	1-2 veces al día
<b>Sitagliptina (Januvia®)</b>	Tmax	1-4h
	T1/2	12,4h
	Dosificación	1 vez al día

**Tabla 3. Fármacos inhibidores de la DPP4 de administración por vía oral. Se muestra el tiempo necesario para alcanzar su concentración máxima, el tiempo de vida media y la frecuencia de dosificación (11).**

Conociendo los diferentes fármacos agonistas de GLP-1 e inhibidores de DPP4 sabemos que además de controlar la hiperglucemia son capaces de disminuir el peso corporal, no siendo esta la indicación principal en la mayoría de los casos y atendiendo a la comorbilidad de la Diabetes Mellitus tipo 2 y la obesidad, nos planteamos la siguiente hipótesis.

## 2. Hipótesis

Si los fármacos agonistas de GLP-1 e inhibidores de DPP4 aumentan la secreción de insulina, entonces pueden ser utilizados en la prevención de la Diabetes Mellitus tipo 2 en individuos obesos.

## 3. Objetivos

- Conocer el mecanismo de acción de la insulina y el de la resistencia a la insulina.
- Obtener información de fuentes solventes sobre fármacos agonistas de GLP-1 e inhibidores de DPP4.
- Diseñar un experimento en un modelo murino para estudiar las modificaciones que, sobre variables metabólicas concretas, sean condicionadas por un fármaco agonistas de GLP-1 y otro inhibidor de DPP4.
- Aprender a hacer un diseño experimental y comunicar resultados de un trabajo científico basado en la experiencia de un grupo de investigación.

## 4. Material y Métodos

### 4.1 Búsqueda bibliográfica

- Material obtenido de internet
  - Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Palabra clave: “incretins”, “GLP-1”, “GIP”, “energy metabolism”.
  - Google Scholar (<https://scholar.google.es/>). Términos de búsqueda: “incretinas”, “metabolismo energético”, “GLP-1”, “GIP”, “DPP4”.
  - Botplus (<https://botplusweb.portalfarma.com>). Elementos de búsqueda: “Byetta”, “Lyxumia”, “Victoza”, “Saxenda”, “Bydureon”, “Trulicity”, “Ozempic”, “Jalra”, “Januvia”
- Material obtenido de libros
  - Boron W. F., Boulpaep, E. L. (2008). Medical Physiology. Segunda edición. Editorial Saunders.

- Hall, J. E. (2016). Tratado de Fisiología Médica. Decimotercera edición. Guyton y Hall.
  - Martini, F. H., Timmons, M. J., Tallitsch, R. B. (2009). Sistema endocrino. Anatomía humana. Sexta edición. Pearson Educación S.A. pp: 507.
  - McKee, T., Mckee, J. R. (2016). Metabolismo de los carbohidratos. Bioquímica. Las bases moleculares de la vida. Quinta edición. McGraw Hill.
  - Voet, D., Pratt, C. W., & Voet, J. G. (2007). Fundamentos de Bioquímica: La vida a nivel molecular. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana.
- TFG previos tutelados por el Dr. Hernández y la Dra. Velázquez
- Hermoso Palmer R. (2021). Inflamación, obesidad y Síndrome Metabólico. Trabajo Fin de Grado, Universidad de La Laguna.
  - Beitia de Busturia M. (2020). Dimorfismo sexual en un modelo de Síndrome Metabólico. Trabajo Fin de Grado, Universidad de La Laguna.
  - Cárdenes Brito R. (2017). Síndrome metabólico y actividad del receptor de mineralocorticoides. Trabajo Fin de Grado, Universidad de La Laguna.

## 4.2 Diseño Experimental

### A) Animales

Se usarán ratones C57BL/6 como población control (Wild Type, WT) y los  $Lepr^{db/db}$  y  $Lep^{ob/ob}$  como modelos de enfermedad, machos para evitar los cambios en la concentración de hormonas sexuales durante el ciclo ovárico.

El ratón  $Lep^{ob/ob}$  es un modelo de obesidad severa que deriva de una mutación espontánea en el gen de la proteína leptina descubierta en ratones de fondo genético C57BL/6 en *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, Maine en 1949). Las características fenotípicas de este ratón son obesidad, hiperfagia, hiperglicemia transitoria, intolerancia a la glucosa e insulina plasmática elevada (16). La hiperglucemia es evidente desde la semana 4 de edad, si bien la

glucemia sigue aumentando, alcanzando su acmé entre el tercer y quinto mes de vida. Por las características mencionadas podemos considerarlo como modelo de obesidad en el adulto (15).

La cepa  $Lepr^{db/db}$ , también creada en *Jackson Laboratory*, es el resultado de una mutación autosómica recesiva del receptor de leptina, que genera un receptor no funcional. Son animales hiperfágicos, obesos, hiperinsulinémicos e hiperglucémicos. Como la hiperglucemia se desarrolla entre la cuarta y octava semana de vida, lo planteamos como modelo de obesidad prepuberal (15) (16).

#### B) Grupos experimentales

Se usarán ratones de 3 meses de edad, cuando ya presentan las características de su fenotipo, usando 8 animales por grupo. Se les administrará el vehículo (NaCl 0,9%) o el fármaco según se muestra en las Tablas 4 y 5, respectivamente, por vía intraperitoneal, durante 5 semanas (17).

Las dosis a administrar de los fármacos en estudio son: A) Exenatida: 12.5, 25 y 50 nmol/kg, respectivamente (23). B) Sitagliptina: 5, 10 y 20 mg/kg, respectivamente (24).

<b>Grupo</b>	<b>Tipo ratón</b>	<b>Vehículo</b>	<b>Exenatida</b>
<b>1</b>	WT	Sí	No
<b>2</b>	WT	No	Sí
<b>3</b>	$Lep^{ob/ob}$	Sí	No
<b>4</b>	$Lep^{ob/ob}$	No	Sí
<b>5</b>	$Lepr^{db/db}$	Sí	No
<b>6</b>	$Lepr^{db/db}$	No	Sí

**Tabla 4. Estructura del diseño experimental para un agonista de GLP-1 (Exenatida).**

Grupo	Tipo ratón	Vehículo	Sitagliptina
1	WT	Sí	No
2	WT	No	Sí
3	Lep <sup>ob/ob</sup>	Sí	No
4	Lep <sup>ob/ob</sup>	No	Sí
5	Lepr <sup>db/db</sup>	Sí	No
6	Lepr <sup>db/db</sup>	No	Sí

Tabla 5. Estructura del diseño experimental para un inhibidor de DPP4 (Sitagliptina).

Las variables a determinar son:

- **Peso corporal:** Control de peso semanal durante las 5 semanas del experimento (18).
- **Análisis de la composición corporal:** Mediante "Dual Energy X-ray Absorptiometry" (DEXA; Piximus Luna) se medirá la densidad mineral ósea (DMO), el contenido mineral óseo (CMO), el tejido magro, el tejido graso, el porcentaje de grasa corporal. Los animales son anestesiados (37.5 mg/kg ketamina + 0.5 mg/kg medetomidina) revirtiendo con 1 mg/kg atipemazol, una vez finalizado el procedimiento (18).
- **Glucemia:** Tras 12-14 horas de ayuno en muestras de sangre obtenidas de la cola del animal, utilizando un glucómetro comercial (OneTouch Ultra de Johnson & Johnson) (18).
- **Tolerancia a la glucosa (GTT):** A animales en ayuno durante la noche, se les inyecta por vía intraperitoneal un bolo de glucosa (2g/kg de peso corporal). La glucemia se mide antes (t=0) y 5, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección (18).
- **Insulinemia:** Mediante un kit comercial ELISA de determinación de insulina (Mercodia) en muestras de plasma extraídas a tiempo 0, 15, 30 y 120 minutos del test de tolerancia a glucosa. La sangre para la obtención del plasma es extraída en tubos de EDTA (18).
- **Tolerancia a la insulina (ITT):** Tras administrar por vía intraperitoneal 0,5 UI/kg de insulina, se determinará la glucemia de igual manera que en

la prueba anterior. Se realizará 0, 15, 30, 90 y 120 minutos tras la inyección (18).

- **Concentraciones plasmáticas de incretinas:** Mediante sendos KITS de ELISA, se cuantificará GIP y GLP-1 en muestras de plasma extraídas a 0, 5 y 30 minutos de la prueba de tolerancia a glucosa. La sangre es extraída en tubos de EDTA con Aprotinina, añadida para evitar la degradación de estas hormonas (19).

## 5. Conclusiones

1. Se han adquirido conocimientos actualizados sobre las incretinas y su reciente incorporación farmacológica para el tratamiento de la DMT2 y la posibilidad de nuevos usos.
2. Se ha investigado sobre los agonistas de GLP-1 y los inhibidores de la DPP4, como posible tratamiento preventivo de Diabetes Mellitus Tipo 2 en pacientes con obesidad.
3. Se han adquirido conocimientos, habilidades y destrezas relacionadas con el planteamiento y la escritura de un proyecto de investigación que ha desembocado en la propuesta de un diseño experimental para responder a las preguntas planteadas en los objetivos de este trabajo.

## 6. Bibliografía

1. Hall, J. E. (2016). Tratado de Fisiología Médica. Decimotercera edición. Guyton y Hall.
2. McKee, T., Mckee, J. R. (2016). Metabolismo de los carbohidratos. Bioquímica. Las bases moleculares de la vida. Quinta edición. McGraw Hill.
3. Voet, D., Pratt, C. W., & Voet, J. G. (2007). Fundamentos de bioquímica: La vida a nivel molecular. Segunda edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
4. Martini, F. H., Timmons, M. J., Tallitsch R. B. (2009). Sistema endocrino. Anatomía humana. Sexta edición. Pearson Educación S.A. pp: 507.
5. Leung, P. S. (2010). Physiology of the pancreas. The renin-angiotensin system: Current research progress in the pancreas, 690: 13. doi:10.1007/978-90-481-9060-7\_2
6. Dolenšek, J., Rupnik, M. S., & Stožer, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. Informa UK Limited. doi:10.1080/19382014.2015.1024405
7. Olivares, J. A., Arellano, A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. Revista de Educación de Bioquímica, 27:9
8. Gutiérrez, R. C., Roura, G. A., Olivares, J. A. (2007). Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina: Una actualización. Gaceta Médica de México artículo de revisión, 153: 214.
9. Carrera, C. A., & Martínez-Moreno, J.M. (2013). Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2: más allá del dúo "déficit de resistencia a la insulina-secreción". Nutrición hospitalaria, 28 :78. doi:10.3305/nh.2013.28.sup2.6717
10. Pallardo, L.F. (2008). Avances en Diabetología. Revista Oficial de la Sociedad Española de Diabetes, 24:1.
11. Base de Datos de medicamentos del Consejo General de Colegios Farmacéuticos (Bot PLUS 2.0): <https://botplusweb.portalfarma.com>
12. Reyes, F. A., Pérez, M. L., Alfonso, E., Céspedes, Y., Ardevol, E. (2015). Las incretinas como nueva opción terapéutica. Revista Cubana de Medicina, 54.



13. Holst, J. J., Gasbjerg, L. S., & Rosenkilde, M. M. (2021). The role of incretins on insulin function and glucose homeostasis. *Endocrinology*, 162: 1. doi:10.1210/endo/bqab065
14. Kim, W., & Egan, J. M. (2008). The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacological Reviews*, 60: 470. doi:10.1124/pr.108.000604
15. King, A. J. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British journal of pharmacology*, 166, 877. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x
16. The Jackson Laboratory. Bar Harbor, Maine. <https://www.jax.org>
17. Xu, Y., Van Hul, M., Suriano, F., Pr at, V., Cani, P. D., & Beloqui, A. (2020). Novel strategy for oral peptide delivery in incretin-based diabetes treatment *BMJ*. doi:10.1136/gutjnl-2019-319146
18. Sierra-Ramos, C., Velazquez-Garcia, S., Vastola-Mascolo, A., Hern andez, G., Faresse, N., & Alvarez de la Rosa, D. (2020). SGK1 activation exacerbates diet-induced obesity, metabolic syndrome and hypertension. *The Journal of endocrinology*, 244, 149. doi:10.1530/JOE-19-0275.
19. Matsumoto, T., Harada, N., Azuma, M., Chihara, Y., Murase, K., Tachikawa, R., Minami, T., Hamada, S., Tanizawa, K., Inouchi, M., Oga, T., Mishima, M., & Chin, K. (2016). Plasma Incretin Levels and Dipeptidyl Peptidase-4 Activity in Patients with Obstructive Sleep Apnea. *Annals of the American Thoracic Society*, 13, 1378. doi:10.1513/AnnalsATS.201510-697OC
20. Hermoso Palmer R. (2021). Inflamación, obesidad y Síndrome Metabólico. Trabajo Fin de Grado, Universidad de La Laguna.
21. Beitia de Busturia M. (2020). Dimorfismo sexual en un modelo de Síndrome Metabólico. Trabajo Fin de Grado, Universidad de La Laguna.
22. Cárdenes Brito R. (2017). Síndrome metabólico y actividad del receptor de mineralocorticoides. Trabajo Fin de Grado, Universidad de La Laguna.
23. Mansur, S. A., Mieczkowska, A., Flatt, P. R., Chappard, D., Irwin, N., & Mabilleau, G. (2019). The GLP-1 receptor agonist exenatide ameliorates

- bone composition and tissue material properties in high fat fed diabetic mice Frontiers Media SA. doi:10.3389/fendo.2019.00051
24. Mondragon, A., Davidsson, D., Kyriakoudi, S., Bertling, A., Gomes-Faria, R., Cohen, P., Rothery, S., Chabosseau, P., Rutter, G. A., & da Silva Xavier, G. (2014). Divergent effects of liraglutide, exendin-4, and sitagliptin on beta-cell mass and indicators of pancreatitis in a mouse model of hyperglycaemia. PloS one, 9, e104873. doi:10.1371/journal.pone.0104873
25. Boron W. F., Boulpaep, E. L. (2008). Medical Physiology. Segunda edición. Editorial Saunders.
26. Agencia Europea de Medicamentos (EMA). [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ozempic-epar-product-information\\_es.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ozempic-epar-product-information_es.pdf)
27. Centro de información online de medicamentos de la AEMPS (CIMA). [https://cima.aemps.es/cima/dohtml/p/1171251003/P\\_1171251003.html](https://cima.aemps.es/cima/dohtml/p/1171251003/P_1171251003.html)
28. Medline Plus. <https://medlineplus.gov/spanish/druginfo/meds/a619057-es.html>
29. Food and Drug Administration (FDA). <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/la-fda-aprueba-un-nuevo-tratamiento-farmacologico-para-el-control-de-peso-cronico-el-primero-desde>
30. Agencia Europea de Medicamentos (EMA). [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/saxenda-epar-product-information\\_es.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/saxenda-epar-product-information_es.pdf)