

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 731 294**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2016 PCT/IB2016/051087**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2016 WO16135702**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2016 E 16714534 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 3262420**

54 Título: **Método para el diagnóstico precoz de un estado prediabético y de diabetes tipo 2**

30 Prioridad:

26.02.2015 PL 41139015

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.11.2019

73 Titular/es:

**INSTYTUT BIOLOGII DOSWIADCZALNEJ IM. M.
NENCKIEGO POLSKIEJ AKADEMII NAUK
(100.0%)
ul. Ludwika Pasteura 3
02-093 Warszawa, PL**

72 Inventor/es:

**DOBRZYN , AGNIESZKA;
KOZINSKI, KAMIL;
BEDNARSKI, TOMASZ y
DOBRZYN, PAWEL**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 731 294 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para el diagnóstico precoz de un estado prediabético y de diabetes tipo 2

La presente invención se refiere a la evaluación de la salud metabólica de un mamífero, incluyendo un ser humano, determinando si dicho animal está en un estado normal, prediabético o diabético a través de la evaluación de la proporción relativa del nivel de las proteínas Wnt4 y Wnt3a en el plasma sanguíneo.

La diabetes tipo 2 (DT2) es uno de los trastornos metabólicos más habituales, cuya prevalencia se estima que es de aproximadamente 171 millones de afectados en todo el mundo y este número sigue creciendo rápidamente cada año (Wild *et al.*, 2004, Diabetes Care). Esta enfermedad se caracteriza por una resistencia periférica a la insulina y por una disfunción de las células β pancreáticas (Kadowski, 2000, J Clin Invest). La obesidad es el principal factor predisponente para la DT2. Sin embargo, solamente una parte de los individuos obesos desarrollará diabetes ya que no son capaces de compensar la resistencia sistémica a la insulina por un aumento adaptativo de la secreción de insulina (Chan *et al.*, 1994, Diabetes Care). La capacidad de las células β pancreáticas para evitar la hiperglucemia es un factor clave en la prevención del desarrollo de DT2. La respuesta compensatoria de las células β se logra principalmente debido a la expansión de la masa de células β (Kulkarni *et al.*, 2004, J. Clin. Invest.). Sin embargo, el mecanismo exacto que regula la plasticidad de las células β dista mucho de estar claro. Se ha demostrado que la masa de células β en pacientes diabéticos no solamente no logra expandirse, sino que también se reduce significativamente (Butler *et al.*, 2003, Diabetes). Por tanto, un tratamiento que pueda prolongar el proceso de adaptación de las células β pancreáticas en pacientes diabéticos permitirá la restauración a largo plazo de la normoglucemia.

Hay un creciente número de evidencias de que los factores circulantes pueden regular la función de las células β de manera paracrina. Teniendo en cuenta tanto las propiedades proliferativas de varias adipocinas liberadas por adipocitos (Marques *et al.*, 1998, Am J Physiol.) como el papel clave del tejido adiposo como órgano endocrino (Mc Gown *et al.*, 2014, Clin Liver Dis.), está justificado suponer que este tejido puede contribuir a la adaptación de la masa de células β . Hace poco tiempo se mostró que los adipocitos humanos secretan moléculas de señalización de Wnt que eran potentes en la inducción de proliferación de células β y secreción de insulina *in vitro* (Schinner *et al.*, 2008, Diabetologia). Además, la señalización de Wnt desempeña un papel importante en el desarrollo muscular (von Maltzahn *et al.*, Trends in Cell Biol, 2012), la hipertrofia cardíaca (Bergmann, Circulación Research 2010) y en la adipogénesis (Christodoulides *et al.*, Trends Endocrinol Metab, 2009).

Algunos estudios de asociación de genoma completo han revelado varios locus genómicos que confieren susceptibilidad para el desarrollo de DT2. Al menos 14 de esos genes están implicados en el crecimiento y la función de los islotes. Adicionalmente, siete de ellos son o bien componentes o bien dianas de la ruta de señalización de Wnt (Liu y Habener, Adv in Exp Med and Biol, 2010). La variación genética dentro del gen que codifica para TCF7L2 se ha mostrado como el factor de riesgo genético de DT2 más importante en varias cohortes de seres humanos (Grant *et al.*, 2006, Nat Genet). La ruta de Wnt dependiente de TCF7L2 está involucrada en el desarrollo y la función del páncreas (Liu y Habener, 2010, dv Exp Med Biol; Logan y Nusse, 2004, Annu Rev Cel Dev Biol) así como en la hipertrofia cardíaca (Malekar *et al.* Hypertension, 2010, Bergmann, Circulation Research 2010). Los polimorfismos encontrados en el gen que codifica para el correceptor de la ruta de Wnt, Lrp5, se han asociado con el fenotipo de obesidad (Twells *et al.*, Genome Res, 2003) y la mutación de cambio de sentido en Lrp6 se ha vinculado con el riesgo de síndrome metabólico (Mani *et al.*, Science, 2007).

Las Wnt, que son proteínas lipidadas, son capaces de inducir proliferación de células β pancreáticas *in vitro* e *in vivo* (Rulifson *et al.*, 2007, PNAS). La inserción condicional de la forma activa de β -catenina en ratones promueve de manera satisfactoria la expansión de células β pancreáticas funcionales (Heiser *et al.*, Development, 2006), mientras que una inserción de un potente inhibidor de Wnt, axina, alteró la proliferación de células β neonatales (Rulifson *et al.*, 2007, PNAS). Además, los ligandos de Wnt estimulan secreción de insulina *in vitro* (Schinner *et al.*, 2008, Diabetologia). La reducción de los niveles de TCF7L2 mediante tratamiento con ARNip tanto en islotes de ratón como humanos, conduce a una secreción de insulina estimulada por glucosa disminuida (Shu *et al.*, Diabetes, 2008; Loder *et al.*, Biochem Soc Trans, 2008; da Silva *et al.*, Diabetes, 2009). Además, la ablación genética del gen que codifica para el correceptor de Wnt, Lrp5, alteró la secreción de insulina en ratones, subrayando por tanto la importancia de la señalización de Wnt en la función de las células β pancreáticas (Fujino *et al.*, 2003, PNAS).

Con estrés patológico, el corazón reactiva varias rutas de señalización que se pensaba tradicionalmente que solamente estaban operativas en el corazón en desarrollo. Una de estas rutas es la ruta de señalización de WNT. La WNT controla el desarrollo cardíaco pero también se modula durante la remodelación cardíaca en el adulto. La activación de la señalización de WNT conduce a miocardiopatía congestiva progresiva (Malekar *et al.* Hypertension, 2010). La inhibición de la señalización de β -catenina nuclear de manera posterior a la ruta canónica de WNT redujo significativamente la mortalidad posinfarto y el deterioro funcional de la función del VI tras ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda de manera crónica. La señalización de WNT también afecta a la movilización y a la migración dirigida de las células progenitoras vasculogénicas derivadas de la médula ósea. Finalmente, se han identificado parejas de interacción de WNT/ β -catenina específicas del corazón que permitirán posiblemente que se seleccione como diana esta ruta de manera específica de tejido. Sin embargo, no se ha

publicado hasta la fecha ningún estudio que vincule la señalización de WNT y la miocardiopatía diabética.

La solicitud de patente JP 2010 222330 da a conocer que la expresión de Wnt3a disminuye significativamente en células pancreáticas tras el desarrollo de diabetes.

5 Datos crecientes acerca de factores circulantes que pueden regular la función de células β y de miocardiocitos de manera paracrina traen una nueva forma de pensar acerca de la interferencia entre diferentes tipos de tejidos en el caso de la fisiopatología de la diabetes tipo 2. Por ejemplo, el hígado por medio de la betatrofina puede promover específicamente la proliferación de células β pancreáticas y expandir la masa de células β (Yi *et al.*, 2013, Cell). Además, Palau y colaboradores mostraron que la obesidad induce regulación por disminución de la secreción de IGFBP3 a partir de un depósito de tejido adiposo que rodea el páncreas, conduciendo por tanto a estimulación de
10 tasa de proliferación de células β (Palau *et al.*, 2012, Endocrinology).

La presente invención se refiere a un método de discriminación entre un estado prediabético y una diabetes establecida, particularmente diabetes tipo 2, caracterizado porque abarca evaluar los niveles de una proteína seleccionada de Wnt4 y Wnt3a en una muestra biológica de un paciente, en particular suero sanguíneo, en el que un nivel anómalo de esta proteína es indicativo de la existencia de un estado prediabético o una diabetes establecida, y:

15 - un estado prediabético está indicado por un nivel disminuido de Wnt4 o un nivel aumentado de Wnt3a, o cuando se producen conjuntamente estas dos anomalías,

- una diabetes establecida, en particular diabetes tipo 2, está indicada por un nivel de Wnt4 aumentado y un nivel de Wnt3a disminuido.

20 Preferiblemente, se examina el nivel de proteínas usando una técnica conocida, tal como ELISA o un inmunoensayo, en particular una prueba de tira reactiva.

Preferiblemente, el sujeto presenta síntomas clínicos concomitantes o porta una predisposición genéticamente determinada a diabetes, particularmente a diabetes tipo II.

Inesperadamente, según la presente invención, los datos de los inventores indican la existencia de una interferencia entre tejidos con resistencia a la insulina s.e. adiposo o muscular y células β pancreáticas. Este fenómeno se produce con el fin de adaptarse a las demandas crecientes de insulina relacionadas con la aparición de diabetes. Según esto, los inventores observaron que los adipocitos con resistencia a la insulina secretan factores que son capaces de inducir secreción de insulina y proliferación de células β pancreáticas. Esto se sugiere por el hallazgo de que células INS1-E incubadas en medio acondicionado con células grasas (FCCM) de adipocitos con resistencia a la insulina incorporan una cantidad en exceso de BrdU y secretan más insulina en comparación con células incubadas en FCCM de adipocitos sensibles a la insulina. En línea con estos estudios, células tratadas con FCCM presentaron regulación por incremento de genes diana de Wnt tales como *cycD1* y *c-myc* que están implicados en el efecto proliferativo (Rulifson *et al.*, 2007, PNAS). Los inventores también encontraron una expresión aumentada de los genes *Anp* y *BNP*, marcadores de hipertrofia cardíaca, en miocardiocitos tratados con FCCM de adipocitos con resistencia a la insulina, lo que indica que los adipocitos con resistencia a la insulina secretan factores que contribuyen a la hipertrofia de los miocardiocitos, la primera característica de miocardiopatía diabética. Además, los inventores establecieron que estos fenómenos están mediados a través de la señalización de Wnt ya que el uso de sFRP, un potente inhibidor de Wnt extracelular, anula la inducción de proliferación y secreción de insulina así como la hipertrofia cardíaca provocada por factores derivados de tejido adiposo. Por tanto, los inventores se centraron en la búsqueda de adipocinas que pudieran ser responsables del proceso de adaptación de las células β y la disfunción cardíaca, con ligandos e inhibidores de Wnt. En los estudios *in vitro* de los inventores, en células sensibles a la insulina tales como miotubos C2C12 y adipocitos 3T3-L1, los inventores han encontrado que *Wnt4*, un inhibidor de la ruta de Wnt canónica, estaba regulado por disminución, y *Wnt3a*, un activador de Wnt canónico, estaba regulado por incremento en el caso de miotubos y adipocitos con resistencia a la insulina. Los inventores también han encontrado que las células con resistencia a la insulina (tanto miotubos C2C12 como adipocitos 3T3) secretan más cantidad de
45 *Wnt3a* y menos de *Wnt4* en comparación con células sensibles a la insulina.

Estos dos ligandos de Wnt se estudiaron más extensamente en un modelo *in vivo* de diabetes inducida por la dieta. Los inventores establecieron como modelo prediabético ratas alimentadas con dieta rica en grasas (HF, *high fat*) de 8 semanas ya que sus células β se adaptaron adecuadamente a la resistencia sistémica a la insulina. Los estudios de los inventores demostraron que, en el estado prediabético, la regulación por disminución de la expresión de *Wnt4* y la regulación por incremento de la expresión de *Wnt3a* en tejido adiposo y músculo con resistencia a la insulina (y los cambios paralelos en el nivel de secreción de Wnt4 y Wnt3a al plasma sanguíneo a partir de estos tejidos) son responsables de la activación de la ruta de señalización de Wnt en células β pancreáticas de manera endocrina. La acumulación de β -catenina activa, elemento principal de la ruta de señalización de Wnt e indicador de la activación de Wnt, se correlaciona con el aumento de la secreción de insulina y la proliferación de células β de islotes de Langerhans aislados (figura 9). Por el contrario, la prolongación de la dieta rica en grasas hasta un periodo de 16 semanas es responsable de una aparición de diabetes grave ya que sus células β ya no se adaptan a la resistencia sistémica a la insulina. De manera interesante, en este estado los inventores han encontrado que el perfil de expresión de *Wnt4* y *Wnt3a* es lo opuesto al del estado prediabético a favor de la regulación por disminución de la

señalización de Wnt canónica. La falta de activación de Wnt en islotes de Langerhans aislados de ratas diabéticas se correlacionó con la regulación por disminución de la tasa de proliferación de células β y con la deficiencia en la producción de insulina (figura 9). Los resultados obtenidos demuestran que los cambios en el perfil de secreción del activador (*Wnt3a*) y el inhibidor (*Wnt4*) canónicos a partir de tejidos con resistencia a la insulina durante el desarrollo de DT2 son responsables de desencadenar la progresión desde el estado prediabético al diabético. Además, la activación de la señalización de Wnt en miocardiocitos en el estado prediabético conduce a hipertrofia cardiaca, una de las características clave de la miocardiopatía diabética. Por tanto, es imperativo el diagnóstico precoz del estado prediabético para prevenir tanto la progresión a DT2 como la disfunción cardiaca asociada con la diabetes.

Tal como puede observarse a partir de la figura 10, DT2 se desarrolla durante un periodo de 10 años antes de su aparición clínica real. El diagnóstico de resistencia a la insulina habitualmente se realiza tarde, y habitualmente se produce casi 10 años después de la aparición de cambios, habitualmente demasiado tarde como para tratarlo. Las pruebas existentes actualmente usadas para el diagnóstico de resistencia a la insulina/estado prediabético incluyen pinzamiento hiperinsulinémico-euglucémico (que es caro y requiere equipo especial disponible solamente en clínicas especializadas) y medición de insulina en plasma (más disponible pero cara y, por tanto, no se realiza durante unas pruebas médicas de rutina). Hasta ahora, no existe ninguna prueba que sea capaz de predecir la aparición de DT2 antes de su desarrollo, de un modo fácil y económico, particularmente de manera más precoz y más fácil que la secreción de insulina aumentada observada en los estados prediabéticos.

La meta de la presente invención es proporcionar una prueba tal fácil de realizar que facilite el diagnóstico particularmente de estados prediabéticos precoces que preceden a la forma completa de diabetes.

Tal problema declarado se ha solucionado inesperadamente mediante la presente invención.

Breve descripción de la invención

La invención se resume en la figura 9. Brevemente, en el estado prediabético los tejidos con resistencia a la insulina (músculo esquelético y tejido adiposo) producen y secretan al plasma sanguíneo menos cantidad de inhibidor (*Wnt4*) y más de activador (*Wnt3a*) de la ruta de señalización de Wnt canónica, lo que conduce a la regulación por incremento de la señalización de Wnt en células β pancreáticas y miocardiocitos de manera endocrina. La ruta de Wnt activada desencadena la adaptación de células β a la resistencia sistémica a la insulina aumentando la secreción de insulina y la tasa de proliferación de células β . Simultáneamente, la señalización de Wnt aumentada en los miocardiocitos conduce a la regulación por incremento de genes hipertrofiantes, ANP y BNP, e inician la hipertrofia de miocardiocitos, un rasgo característico conocido de la miocardiopatía diabética. En el estado diabético, los tejidos con resistencia a la insulina producen y secretan al plasma sanguíneo más cantidad de inhibidor (*Wnt4*) y menos de activador (*Wnt3a*) de la ruta de señalización de Wnt canónica, lo que tiene repercusión en la regulación por disminución de la señalización de Wnt en células β pancreáticas. La reducción de la activación de la ruta de Wnt afecta negativamente a la adaptación de las células β a la resistencia sistémica a la insulina y conduce a la disfunción de los islotes de Langerhans. Por tanto, la proporción relativa del nivel de las proteínas *Wnt4* y *Wnt3a* en plasma sanguíneo podría usarse como biomarcador de los estados prediabético y diabético. La presente invención también se refiere al uso de *Wnt4* y *Wnt3a* como dianas terapéuticas para aliviar los efectos de la insuficiencia diabética de células beta, así como la miopatía cardiaca.

Figuras

Las siguientes figuras se proporcionan para ilustrar mejor la naturaleza de la presente invención, en las que:

La figura 1 muestra que el medio acondicionado con células grasas (FCCM) de adipocitos con resistencia a la insulina (16:0) estimula la proliferación, secreción de insulina y señalización de Wnt en células INS-1E. A. La incubación con 16:0 conduce a resistencia a la insulina en adipocitos 3T3-L1. Se llevó a cabo inmunotransferencia de tipo Western en extractos de adipocitos 3T3-L1 incubados con BSA y 16:0 con anticuerpos contra AKT cinasa fosforilada (Ser473) y total. B. Activación del vector indicador de Wnt (TOP) en células INS-1E con tratamiento con FCCM. Se transfectaron células INS-1E con el vector indicador TOP que porta un gen indicador de luciferasa bajo el control de los sitios de unión a TCF o con el vector indicador FOP con sitios de unión a TCF mutados. La actividad luciferasa se expresa como unidades lumínicas relativas (ULR) medidas como el cociente de los valores de TOP y FOP. C. Inducción de la proliferación de INS-1E con tratamiento con FCCM. La tasa de proliferación se normaliza con respecto a células tratadas con medio de control (DMEM). D. Estimulación de la secreción de insulina de INS-1E con tratamiento con FCCM en condiciones de bajo contenido de glucosa (2,5 mM) y alto contenido de glucosa (15 mM). n=3; media \pm D.E. *p<0,05 frente a DMEM, #p<0,05 frente a control de FCCM (BSA).

La figura 2 muestra que el medio acondicionado con células grasas (FCCM) de adipocitos con resistencia a la insulina (16:0) contiene ligandos de Wnt que inducen proliferación de INS-1E y secreción de insulina a través de la ruta de señalización de Wnt. A. El medio acondicionado con células grasas de adipocitos con resistencia a la insulina (FCCM 16:0) activa el vector indicador de Wnt (TOP) en células INS-1E. Este efecto se suprime por tratamiento con sFRP, un potente inhibidor de Wnt extracelular. Se transfectaron células INS-1E con el vector indicador TOP que porta un gen indicador de luciferasa bajo el control de los sitios de unión a TCF o con el vector indicador FOP con sitios de unión a TCF mutados. La actividad luciferasa se expresa como unidades lumínicas

relativas (ULR) medidas como el cociente de los valores de TOP y FOP. B. El medio acondicionado con células grasas de adipocitos con resistencia a la insulina (FCCM 16:0) induce la expresión de genes relacionados con la señalización de Wnt en células INS-1E. Este efecto se suprime mediante tratamiento con sFRP, se usó β -actina como control de normalización. C. La estimulación de la secreción de insulina de INS-1E con tratamiento con FCCM en condiciones de bajo contenido de glucosa (2,5 mM) y alto contenido de glucosa (15 mM) se suprime mediante tratamiento con sFRP. D. La inducción de la proliferación de INS-1E con tratamiento con FCCM (16:0) se suprime mediante tratamiento con sFRP. La tasa de proliferación de las células INS-1E se expresa en relación con las células tratadas con medio de control (DMEM); n=3; media \pm D.E. *p<0,05 frente a DMEM, #p<0,05 frente a FCCM (BSA), &p<0,05 frente a FCCM (16:0).

La figura 3 muestra que el medio acondicionado con células grasas (FCCM) de adipocitos con resistencia a la insulina (16:0) contiene ligandos de Wnt que inducen secreción de insulina y proliferación de islotes de Langerhans a través de la ruta de señalización de Wnt. A. El medio acondicionado con células grasas de adipocitos con resistencia a la insulina (FCCM 16:0) induce la expresión de genes relacionados con la señalización de Wnt en islotes de Langerhans. Se usó β -actina como control de normalización. B. El FCCM estimula la secreción de insulina en islotes de Langerhans en condiciones de bajo contenido de glucosa (2,5 mM) y alto contenido de glucosa (15 mM) y (C.) aumenta la tasa de proliferación de células β en islotes de Langerhans. Estos efectos se suprimieron mediante tratamiento con sFRP. n=3; media \pm D.E. *p<0,05 frente a DMEM, #p<0,05 frente a FCCM (BSA), &p<0,05 frente a FCCM (16:0). sFRP, un potente inhibidor de Wnt extracelular.

La figura 4 muestra que el perfil de expresión génica, los niveles de proteínas celulares y la secreción de Wnt4 y Wnt3a están alterados en adipocitos con resistencia a la insulina. A. Análisis por PCR en tiempo real de genes relacionados con Wnt en adipocitos 3T3-L1 (A1) y miotubos C2C12 (A2). Se usó β -actina como control de normalización. n=3; media \pm D.E. *p<0,05 frente a 3T3 (BSA). B. En adipocitos (B1) y miotubos (B2) con resistencia a la insulina (16:0) el contenido de la proteína Wnt4 se reduce y el contenido de la proteína Wnt3a aumenta en comparación con células sensibles a la insulina de control (BSA). Se llevó a cabo inmunotransferencia de tipo Western con lisados celulares de 3T3-L1 y C2C12 usando anticuerpo contra las proteínas Wnt4 y Wnt3a. Se usó β -tubulina como control de carga. C. Nivel de secreción de Wnt4 y Wnt3a a partir de los adipocitos 3T3 y miotubos C2C12. El medio acondicionado de adipocitos (FCCM 16:0) (C1) y miotubos (MCCM 16:0) (C2) con resistencia a la insulina contiene menos cantidad de Wnt4 y más de Wnt3a en comparación con los medios de células sensibles a la insulina de control (BSA). Se realizó inmunotransferencia de tipo Western con FCCM y MCCM usando anticuerpo contra las proteínas Wnt4 y Wnt3a. Se usó como control de carga la tinción de Ponceau.

La figura 5 muestra que la expresión génica, el nivel de proteínas y la tasa de secreción de Wnt4 y Wnt3a en tejido adiposo blanco y músculos gemelos con resistencia a la insulina están alterados en estado prediabético. A. Se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa en ratas alimentadas con dieta rica en grasas prediabéticas y alimentadas con CHOW de 8 semanas después de ayuno durante la noche. n=6; media \pm D.E. *P<0,05 frente a CHOW. B. En tejido adiposo con resistencia a la insulina de ratas prediabéticas, la expresión génica (B1) y el nivel de proteínas (B2) de Wnt4 se reducen y de Wnt3a aumentan en comparación con los tejidos de ratas alimentadas con CHOW. Se usó β -actina como control de normalización. n=6; media \pm D.E. *p<0,05 frente a CHOW. C. En músculo esquelético con resistencia a la insulina de ratas prediabéticas, la expresión génica (C1) y el nivel de proteínas (C2) de Wnt4 y Wnt3a están significativamente alterados. D. El contenido de Wnt4 y Wnt3a en plasma sanguíneo de ratas prediabéticas. Se llevó a cabo inmunotransferencia de tipo Western en un suero sanguíneo de ratas alimentadas con CHOW y alimentadas con HF usando anticuerpo contra las proteínas Wnt4 y Wnt3a. Se usó como control de carga la tinción de Ponceau. n=6.

La figura 6 muestra la expresión génica, el nivel de proteínas y la tasa de secreción de Wnt4 y Wnt3a en tejido adiposo blanco y músculos gemelos con resistencia a la insulina en estado diabético. A. Se llevó a cabo una prueba de tolerancia a la glucosa en ratas alimentadas con HF y alimentadas con CHOW de 16 semanas después de ayuno durante la noche. n=6; media \pm D.E. *p<0,05 frente a CHOW. B. La expresión génica (B1) y el nivel de proteínas (B2) de Wnt4 se reducen y de Wnt3a aumentan en tejido adiposo con resistencia a la insulina de ratas diabéticas (HF) en comparación con tejidos de ratas sanas (alimentadas con CHOW). Se usó β -actina como control de normalización. n=6; media \pm D.E. *p<0,05 frente a CHOW. C. En músculo esquelético con resistencia a la insulina de ratas diabéticas (HF), la expresión génica (C1) y el nivel de proteínas (C2) de Wnt4 y Wnt3a están significativamente alterados. D. El contenido de Wnt4 y Wnt3a en plasma sanguíneo de ratas diabéticas (HF). Se llevó a cabo inmunotransferencia de tipo Western en un suero sanguíneo de ratas alimentadas con CHOW y alimentadas con HF usando anticuerpo contra las proteínas Wnt4 y Wnt3a. Se usó como control de carga la tinción de Ponceau. n=6.

La figura 7 muestra el estado de la adaptación de células β a la resistencia sistémica a la insulina en ratas alimentadas con HF. A. Contenido de β -catenina activa en islotes de Langerhans de ratas alimentadas con HF prediabéticas (A₁) y diabéticas (A₂). Se llevó a cabo inmunotransferencia de tipo Western en extractos de islotes de Langerhans usando anticuerpo contra β -catenina activa. Se usó β -actina como control de carga. B. Secreción de insulina de islotes de Langerhans de ratas alimentadas con HF prediabéticas (B₁) y diabéticas (B₂) en condiciones de bajo contenido de glucosa (2,75 mM) y alto contenido de glucosa (16,5 mM). n=6; media \pm D.E. *p<0,05 frente a CHOW. C. Tasa de proliferación de células β en islotes de Langerhans de ratas alimentadas con HF prediabéticas (C₁) y diabéticas (C₂). La tasa de proliferación de islotes de Langerhans se expresa como el cociente de puntos de

BrdU y el área de la sección de los islotes de Langerhans. n=15; media \pm E.E.M.

La figura 8 muestra que el medio acondicionado con células grasas (FCCM) de adipocitos con resistencia a la insulina (16:0) contiene ligandos de Wnt que inducen hipertrofia de miocardiocitos a través de la ruta de señalización de Wnt. A. Nivel de proteína de ANP en miocardiocitos HL1 (A1) y H9C2 (A2). B.-C. Expresión génica de ANP y BNP en miocardiocitos HL1 (B1-C1) y H9C2 (B2-C2). n=3; media \pm D.E. *p<0,05 frente a Claycomb, #p<0,05 frente a FCCM (BSA), &p<0,05 frente a FCCM (16:0). sFRP, un potente inhibidor de Wnt extracelular, ANP, BNP, marcadores de hipertrofia cardíaca.

La figura 9 muestra que los ligandos de Wnt contribuyen a la adaptación de las células β a la resistencia sistémica a la insulina. En estado prediabético, los tejidos con resistencia a la insulina (tejido adiposo y músculo esquelético) producen menos cantidad de inhibidor (Wnt4) y más de activador (Wnt3a) de la ruta de señalización de Wnt canónica, lo que conduce a la regulación por incremento de la señalización de Wnt en células β pancreáticas de manera endocrina. La ruta de Wnt activada desencadena la adaptación de células β a la resistencia sistémica a la insulina aumentando la secreción de insulina y la tasa de proliferación de células β . Simultáneamente, la señalización de Wnt aumentada en miocardiocitos conduce a la regulación por incremento de los genes hipertrofiantes, ANP y BNP, e inicia la hipertrofia de miocardiocitos, un rasgo característico conocido de la miocardiopatía diabética. En el estado diabético, los tejidos con resistencia a la insulina producen más cantidad de inhibidor (Wnt4) y menos de activador (Wnt3a) de la ruta de señalización de Wnt canónica, lo que tiene repercusión en la regulación por disminución de la señalización de Wnt en células β pancreáticas. La reducción de la activación de la ruta de Wnt afecta negativamente a la adaptación de células β a la resistencia sistémica a la insulina y conduce a la disfunción de los islotes de Langerhans.

La figura 10 muestra la que extrapolación de la tasa de deterioro observada de la función de las células β en sujetos tratados con dieta sugiere que la pérdida de función de las células β puede comenzar al menos 10 años antes del diagnóstico de diabetes tipo 2 (DT2).

La invención también se demuestra mediante los siguientes ejemplos no limitativos, pero el experto en la técnica considerará inmediatamente desarrollos adicionales, que no obstante no se encuentran fuera del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Los medios acondicionados con células de adipocitos con resistencia a la insulina (FCCM) y de miotubos con resistencia a la insulina (MCCM) contienen factores que inducen la señalización de Wnt, proliferación y secreción de insulina en células β INS-1E a través de la ruta de señalización de Wnt.

Con el fin de investigar la interacción funcional entre tejidos con resistencia a la insulina y células β en el contexto de la adaptación de células β a la resistencia sistémica a la insulina, los inventores usaron medio acondicionado con células grasas (FCCM) de adipocitos con resistencia a la insulina y un medio de miotubos C2C12 con resistencia a la insulina (MCCM) para tratar células INS-1E. Se indujo resistencia a la insulina mediante tratamiento con palmitato (16:0) (figura 1A). FCCM de adipocitos sanos humanos (BSA) indujo proliferación, secreción de insulina y señalización de Wnt en células β (figuras 1B-D). De manera interesante, los inventores han encontrado que el medio acondicionado de adipocitos con resistencia a la insulina aumentó la señalización de Wnt, la proliferación y la secreción de insulina en células β hasta un nivel mayor que el tratamiento con medio de células sensibles a la insulina (figuras 1B-D).

Para verificar la influencia de los factores derivados de tejido adiposo sobre la actividad de señalización de Wnt en células β , los inventores han usado un ensayo con indicador de luciferasa. La inducción del vector indicador de TCF en células INS-1E tratadas con FCCM (16:0) durante 24 horas aumentó aproximadamente el doble en comparación con células de control, mientras que FCCM (BSA) impulsó una inducción de actividad transcripcional de TCF 1,5 veces mayor (figura 1A). Los inventores valoraron el efecto de FCCM sobre la tasa de proliferación de INS-1E mediante la prueba de incorporación de BRDu. El tratamiento con FCCM (16:0) aumentó la proliferación de INS-1E 2,6 veces con respecto a las células de control mientras que FCCM (BSA) provocó una inducción de la tasa de proliferación solamente 1,8 veces mayor (figura 1B). De manera similar, cuando se estimularon células INS-1E con medio de adipocitos con resistencia a la insulina, la secreción de insulina aumentó 2,4 veces en condiciones de alto contenido de glucosa (15,5 mM) mientras que FCCM (BSA) provocó una inducción de menos de 1,5 veces en comparación con las células de control (figura 1C). Estos resultados demostraron claramente que factores derivados de tejido adiposo de adipocitos con resistencia a la insulina están implicados en la inducción de secreción de insulina, proliferación y ruta de señalización de Wnt en células β .

Recientemente, se describieron activadores de Wnt como adipocinas novedosas (Shinner *et al.* 2007; Shinner *et al.*, 2008). Para someter a prueba si la activación de Wnt en células β con tratamiento con FCCM (16:0) se desencadena específicamente por activadores de Wnt derivados de tejido adiposo pero no por otras adipocinas, los inventores han usado antagonista de Wnt soluble (sFRP) para tratar, o bien células β INS-1E o bien islotes de Langerhans aislados, junto con medio acondicionado con células grasas. Se aplicó el medio acondicionado con Wnt3a de células L-Wnt3a

como control positivo. Luego se analizó el contenido de beta-catenina activa (no fosforilada), el elemento clave de la ruta de señalización de Wnt canónica, mediante inmunotransferencia tanto en INS-1E como en islotes de Langerhans. De manera interesante, se observó la mayor acumulación de beta-catenina en células INS-1E e islotes incubados en medio de adipocitos con resistencia a la insulina, y estaba significativamente aumentada en comparación con los controles. De manera más importante, se suprimió por completo este efecto cuando se aplicó sFRP. Con el fin de verificar si la señalización de Wnt afecta al funcionamiento adecuado de las células β , se administró de nuevo sFRP en el diseño experimental. Se inhibió el efecto de inducción del medio de adipocitos con resistencia a la insulina sobre la capacidad secretora de las células INS-1E y los islotes de Langerhans, por sFRP tanto en condiciones de alto contenido de glucosa como de bajo contenido de glucosa (figura 2C y figura 3B). De manera similar, el FCCM de adipocitos con resistencia a la insulina estimuló la proliferación de las INS-1E y los islotes de Langerhans y se redujo este efecto después de sFRP (figura 2D y figura 3C.). Los datos obtenidos sugieren que el medio FCCM (16:0) contiene ligandos de Wnt potentes para estimular la proliferación e inducir la secreción de insulina de células β .

Los inventores también han determinado los niveles de expresión de genes relacionados con Wnt, *CTNNB1* que codifica para beta-catenina, y dos genes diana de Wnt: *myc* y *cyclinD1*. La expresión de los genes mencionados anteriormente estaba regulada por incremento en el caso de tratamiento con FCCM (16:0) (~7,0, ~1,9 y ~24,0 veces de cambio, respectivamente) y mostró un mayor nivel de inducción que células INS-1E tratadas con FCCM (BSA) (~2,0, ~1,0, ~18,0) (figura 2A). Se demostró un resultado similar en los islotes de Langerhans aislados (figura 3A). El efecto de la expresión aumentada de genes relacionados con Wnt se disminuyó por FRP. Adicionalmente, se confirmó la activación de Wnt en células INS-1E con tratamiento con FCCM (16:0) mediante ensayo de indicador de Wnt y mostró un nivel de inducción mayor en un 30% en comparación con células INS-1E tratadas con FCCM (BSA). Se suprimió el efecto de activación mediante la adición de sFRP al medio acondicionado con células grasas. Los resultados anteriores indican que el medio acondicionado con células grasas de adipocitos con resistencia a la insulina contiene activadores de señalización de Wnt que son suficientes como para inducir la ruta de Wnt en células β .

Ejemplo 2

El perfil de expresión de genes que codifican para ligandos de Wnt, el nivel de las proteínas Wnt4 y Wnt3a y la tasa de secreción de estas proteínas están alterados en adipocitos y miotubos con resistencia a la insulina.

Dado que los inventores han mostrado que los adipocitos producen activadores de Wnt suficientes como para activar la señalización de Wnt en células β y para desencadenar proliferación y secreción de insulina, se quiso examinar la identidad de los ligandos de Wnt responsables de tal efecto estimulador. Los inventores han llevado a cabo detección por PCR a tiempo real en adipocitos con resistencia a la insulina con el fin de buscar los posibles cambios en la expresión de los genes que codifican para ligandos de Wnt. Se indujo resistencia a la insulina en adipocitos 3T3-L1 mediante tratamiento con 16:0 y se confirmó mediante una disminución de estado de fosforilación de cinasa AKT con estimulación de insulina, el principal elemento posterior la ruta de la insulina (figura 1A). Los inventores han verificado un amplio repertorio de genes relacionados con Wnt pero solamente tres de ellos presentaron cambios en la expresión génica después de la inducción de resistencia a la insulina en adipocitos 3T3-L1 (figura 4A). De manera interesante, la expresión de *wls*, que codifica para la proteína wntless implicada exclusivamente en la secreción de ligandos de Wnt, estaba regulada por incremento en ~1,2 veces de cambio en adipocitos con resistencia a la insulina. Además, la expresión del gen que codifica para Wnt4 en células 3T3-L1 con resistencia a la insulina estaba regulada por disminución en ~0,8 veces de cambio en comparación con células sensibles a la insulina. Wnt4 es un inhibidor conocido de la ruta de señalización de Wnt canónica (Bernard *et al.*, 2008). Adicionalmente, el gen que codifica para el activador de Wnt canónico, Wnt3a, estaba sobreexpresado en ~1,8 veces de cambio en adipocitos con resistencia a la insulina (4A1). En miotubos C2C12 con resistencia a la insulina (16:0), la expresión de Wnt4 se redujo en un 40% y la expresión de Wnt3a fue 1,8 veces mayor en comparación con las células sanas (BSA) (figura 4A2). Además, estos resultados fueron paralelos a los cambios en el nivel de estas proteínas en lisados celulares (figuras 4B1-B2). De manera importante, los cambios en la expresión génica y los niveles de proteína intracelular de Wnt4 y Wnt3a estaban acompañados por cambios en la tasa de secreción de estas proteínas a partir de adipocitos 3T3 y miotubos C2C12 con resistencia a la insulina. El contenido de Wnt4 en medio acondicionado con células de adipocitos 3T3-L1 con resistencia a la insulina (FCCM 16:0) y en medio acondicionado con células de miotubos C2C12 con resistencia a la insulina (MCCM 16:0) se redujo en 0,5 y 0,8 veces, respectivamente (figuras 4C1-C2) pero la expresión de Wnt3a aumentó en 2,6 y 3,8 veces de cambio, respectivamente (figuras 4C1-C2).

Ejemplo 3

El perfil de expresión de *Wnt4* y *Wnt3a* en tejidos con resistencia a la insulina y la tasa de secreción de estas proteínas a plasma sanguíneo se alteran durante la progresión de la diabetes.

Para investigar si los datos de los estudios *in vitro* concuerdan con los cambios *in vivo*, los inventores analizaron la expresión de *Wnt4* y *Wnt3a* en el tejido adiposo blanco y en músculos gemelos en modelos de animales prediabéticos y diabéticos. Se alimentaron ratas Wistar con dieta rica en grasas (HF, *high fat*) durante 8 semanas o 16 semanas para inducir resistencia a la insulina de tejidos periféricos y diabetes, respectivamente, según se mostró

mediante una prueba de tolerancia a la glucosa (figuras 5A, 6A). Ambos grupos de animales alimentados con HF mostraron un metabolismo de glucosa alterado en comparación con grupos alimentados con CHOW. A continuación, los inventores analizaron el perfil de expresión y el contenido en proteínas de *Wnt4* y *Wnt3a* en tejido adiposo visceral y músculos gemelos. En el estado prediabético, la expresión de *Wnt4* estaba regulada por disminución (~0,4 veces de cambio) mientras que la expresión de *Wnt3a* estaba regulada por incremento (~1,6 veces de cambio) en tejido adiposo con resistencia a la insulina en comparación con tejido adiposo de ratas alimentadas con CHOW sanas (figura 5B1). Se obtuvieron también resultados similares en los niveles de proteína de *Wnt4* y *Wnt3a* en tejido adiposo (~0,6 y ~1,8 veces de cambio, respectivamente) (figura 5B2). El perfil de expresión de *Wnt4* y *Wnt3a* estaba significativamente alterado en músculos gemelos con resistencia a la insulina en comparación con los controles (figuras 5C1-C2). Además, la tasa de secreción de estas proteínas a partir de tejidos con resistencia a la insulina estaba significativamente afectada y, como consecuencia, el nivel de proteína de *Wnt4* en plasma sanguíneo estaba disminuido (en un 20%) mientras que el nivel de proteína de *Wnt3a* estaba significativamente aumentado (~11,7 veces de cambio) en ratas prediabéticas en comparación con animales sanos (figura 5D).

De manera interesante, en ratas diabéticas (16 semanas de dieta HF), la expresión de *Wnt4* estaba significativamente aumentada y *Wnt3a* significativamente reducida tanto en tejido adiposo blanco (figura 6B1) como en músculo esquelético (figura 6C1) en comparación con animales sanos. Adicionalmente, el nivel de proteína de *Wnt4* estaba aumentado en un 30% en tejido adiposo (figura 6B2) y en un 60% en músculo esquelético (figura 2B2) y el nivel de proteína de *Wnt3a* no estaba alterado en tejido adiposo y estaba reducido en un 60% en músculo esquelético (figuras 6B2, C2). De manera más importante, el nivel de proteína de *Wnt4* en plasma sanguíneo estaba aumentado 2,1 veces y *Wnt3a* estaba reducido en un 20% en ratas diabéticas en comparación con animales sanos (figura 6D).

Ejemplo 4

La activación de señalización de Wnt se correlaciona con la adaptación de células β a la resistencia sistémica a la insulina

La siguiente etapa en los estudios de los inventores fue investigar cómo influyen los cambios en el perfil de expresión de los ligandos de Wnt en tejidos con resistencia a la insulina en el funcionamiento de las células β pancreáticas en sus modelos de animales prediabéticos y diabéticos. El análisis por inmunotransferencia de tipo Western de islotes de Langerhans aislados de ratas prediabéticas mostró acumulación de beta-catenina activa (1,9 veces de cambio) (figura 7A1). Este fenómeno estaba asociado con un aumento de la secreción de insulina (~1,8 veces de cambio) (figura 7B1) y la tasa de proliferación (~1,6 veces de cambio) (figura 7C1). En cambio, no hubo ninguna diferencia en el nivel de beta-catenina activa entre islotes de Langerhans aislados de ratas diabéticas en comparación con animales sanos (figura 7A2). Adicionalmente, en el caso de islotes que se originan a partir de animales diabéticos, la capacidad secretora de insulina ya no se vio afectada (figura 7B2) y su tasa de proliferación estaba disminuida en 0,4 veces de cambio en comparación con islotes de Langerhans aislados de ratas alimentadas con CHOW (figura 7C2).

Ejemplo 5

Los medios acondicionados con células de adipocitos con resistencia a la insulina (FCCM) contienen factores que inducen señalización de Wnt e hipertrofia de miocardiocitos a través de la ruta de señalización de Wnt.

La activación de la señalización de Wnt en el corazón puede conducir a hipertrofia cardiaca no adaptativa (Malekar *et al.*, Hypertension 2010). Los inventores sometieron a prueba la hipótesis de que los ligandos de Wnt secretados por tejidos con resistencia a la insulina activan la señalización de Wnt en miocardiocitos e inducen de ese modo la hipertrofia de miocardiocitos, uno de los rasgos característicos de la miocardiopatía diabética. Se llevaron a cabo experimentos con dos líneas celulares de miocardiocitos diferentes, HL1 y H9C2. Los inventores analizaron la expresión del péptido natriurético auricular (ANP) y del péptido natriurético cerebral (BNP), dos marcadores clave de la hipertrofia cardiaca. La incubación con FCCM de adipocitos con resistencia a la insulina (16:0) condujo al aumento del nivel de proteína de ANP en el 50% y el 80% en miocardiocitos HL1 y H9C2, respectivamente, en comparación con los controles de FCCM (BSA) (figuras 8A1-A2). Además, la expresión génica de ANP (figuras 8B1-B2) así como la expresión génica de BNP (figuras 8C1-C2) se indujeron significativamente por FCCM de adipocitos con resistencia a la insulina en las dos líneas de miocardiocitos sometidas a prueba, en comparación con los controles. La regulación por incremento de los marcadores ANP y BNP por FCCM de adipocitos con resistencia a la insulina en miocardiocitos se suprimió después de tratamiento con sFRP (un potente inhibidor de Wnt extracelular) (figura 8). Los datos obtenidos sugieren que los ligandos de Wnt secretados por tejidos con resistencia a la insulina son potentes para activar la señalización de Wnt en el corazón y estimular la hipertrofia de miocardiocitos, y pueden ser uno de los factores clave que conducen a la progresión de la miocardiopatía diabética (figura 9).

REIVINDICACIONES

- 5
1. Método de discriminación entre un estado prediabético y una diabetes establecida, particularmente diabetes tipo 2, caracterizado porque abarca evaluar los niveles de una proteína seleccionada de Wnt4 y Wnt3a en una muestra biológica de un paciente, en particular suero sanguíneo, en el que un nivel anómalo de esta proteína es indicativo de la existencia de un estado prediabético o de una diabetes establecida, y:
- un estado prediabético está indicado por un nivel disminuido de Wnt4 o un nivel aumentado de Wnt3a, o cuando se producen conjuntamente estas dos anomalías,
 - una diabetes establecida, en particular diabetes tipo 2, está indicada por un nivel de Wnt4 aumentado y un nivel de Wnt3a disminuido.
- 10
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el nivel de proteínas se evalúa usando una técnica conocida tal como ELISA o un ensayo inmunológico, en particular una prueba de tira reactiva.
3. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque un paciente también presenta otros signos clínicos o porta una predisposición genéticamente determinada a diabetes, en particular a diabetes tipo 2.

15

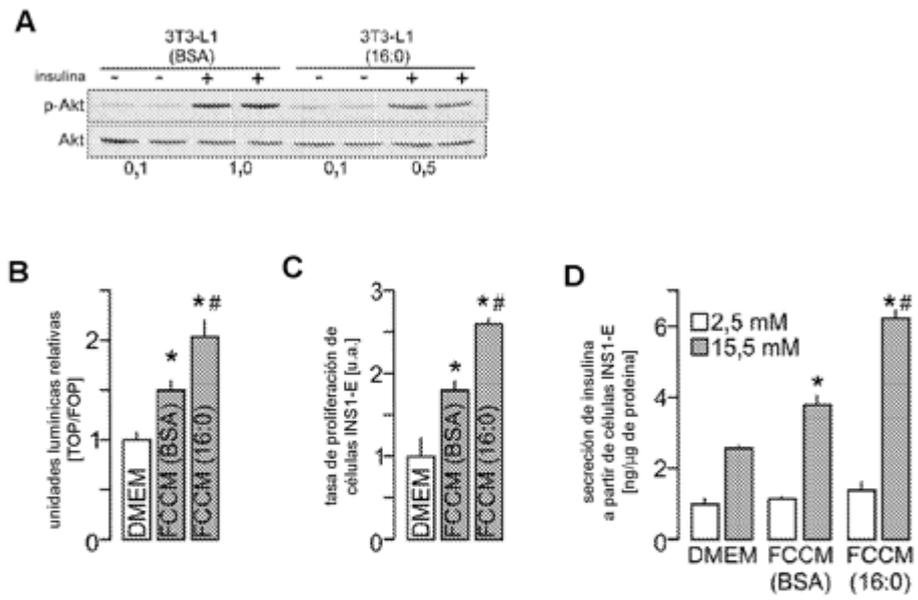


Fig. 1

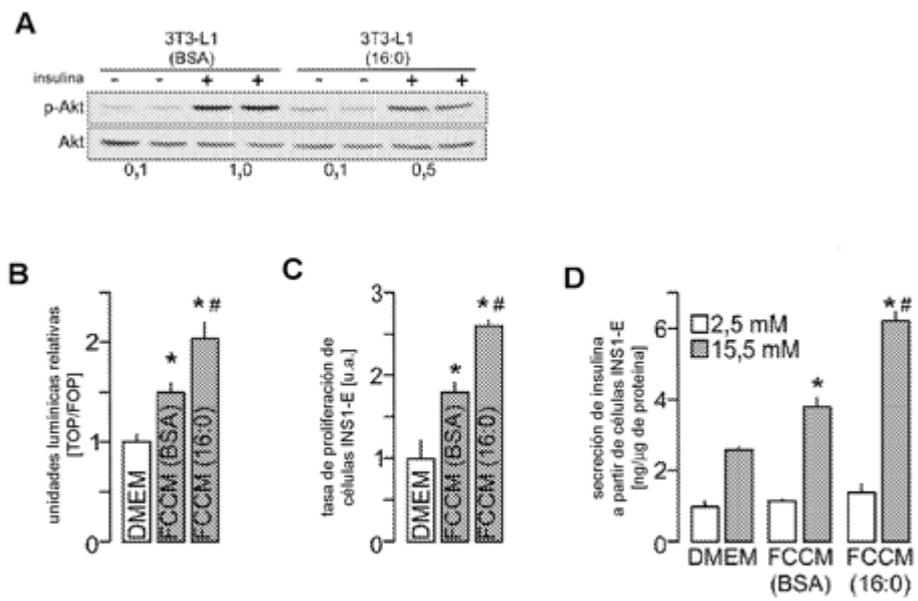


Fig. 2

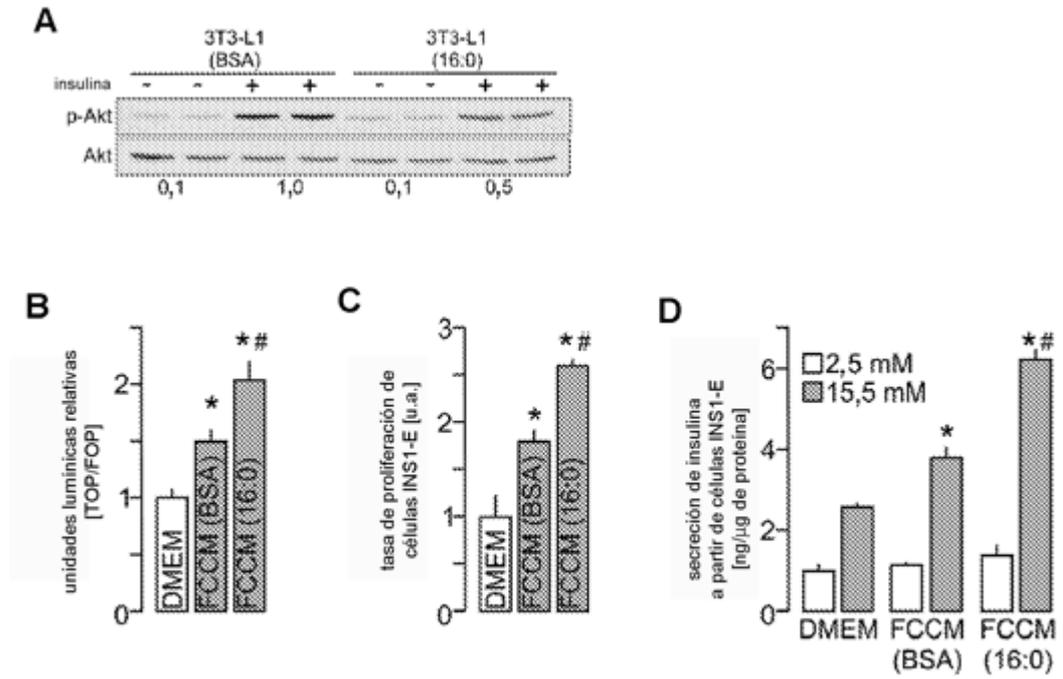


Fig. 3

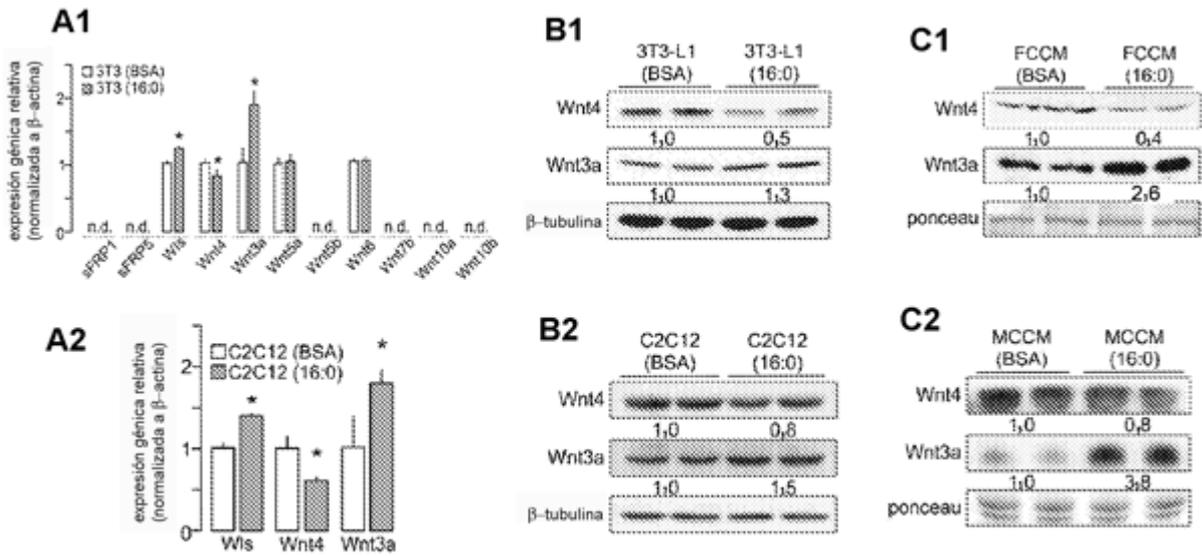


Fig. 4

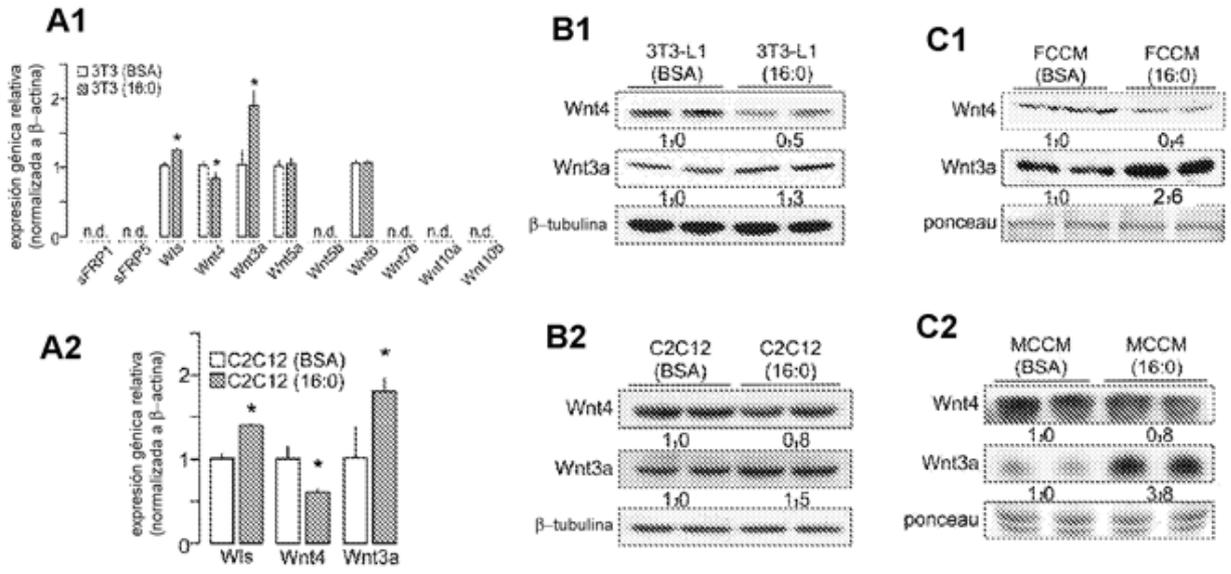


Fig. 5

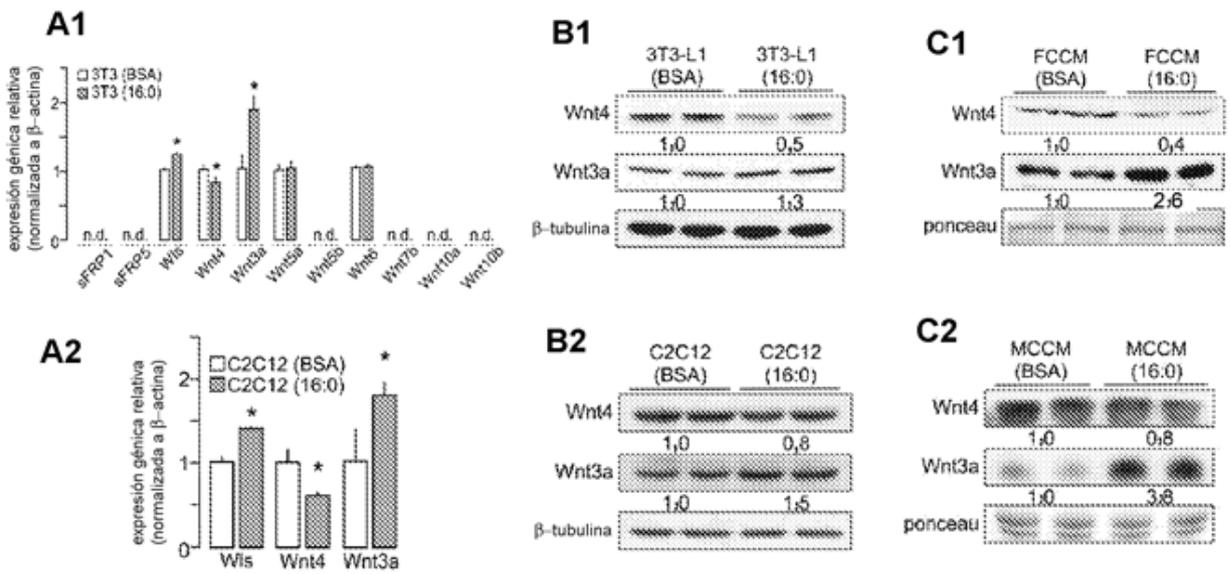


Fig. 6

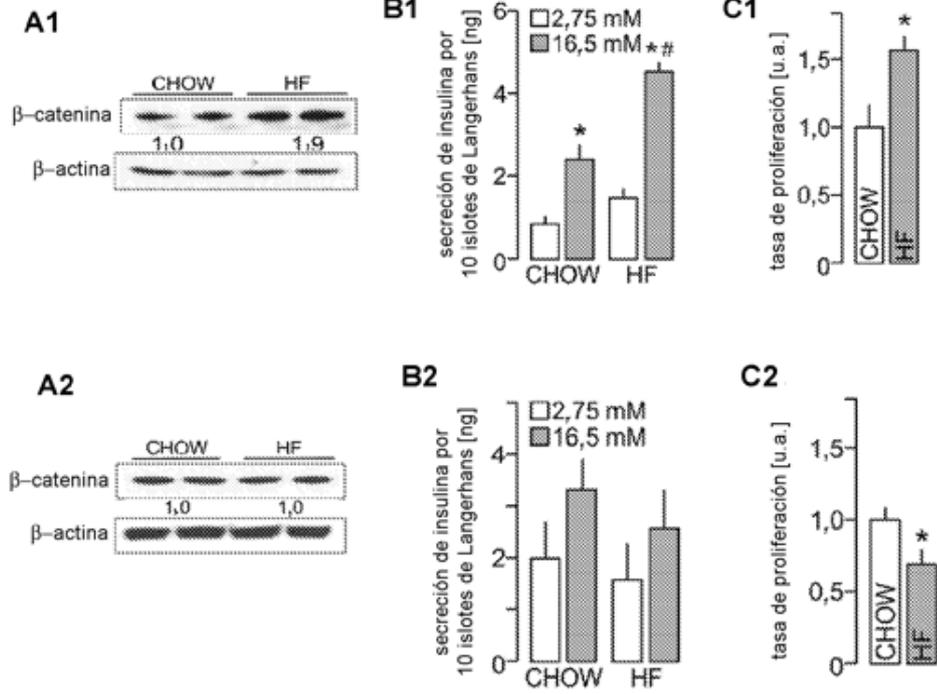
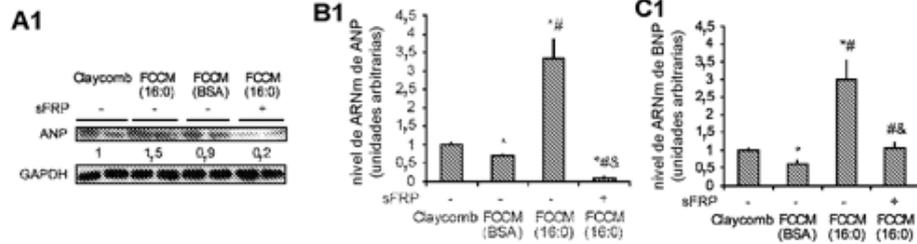


Fig. 7

Cardiomiocitos HL-1



Cardiomiocitos H9C2

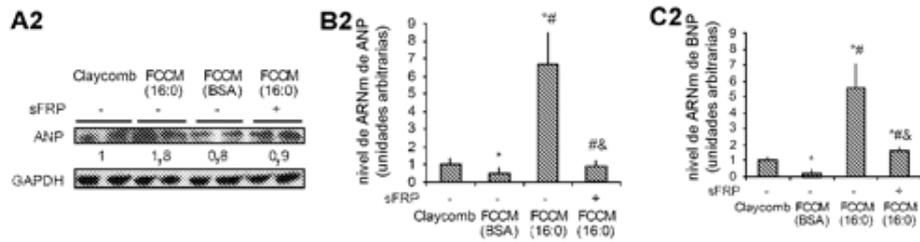


Fig. 8

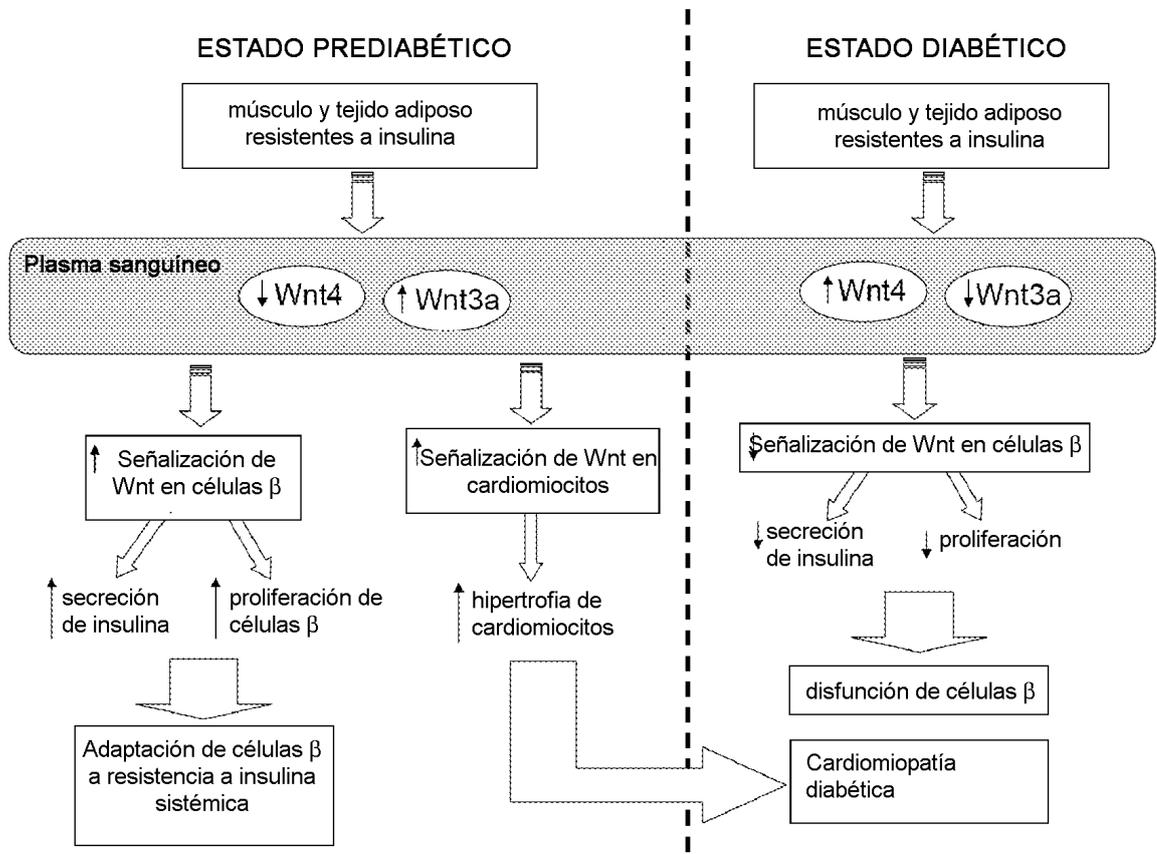
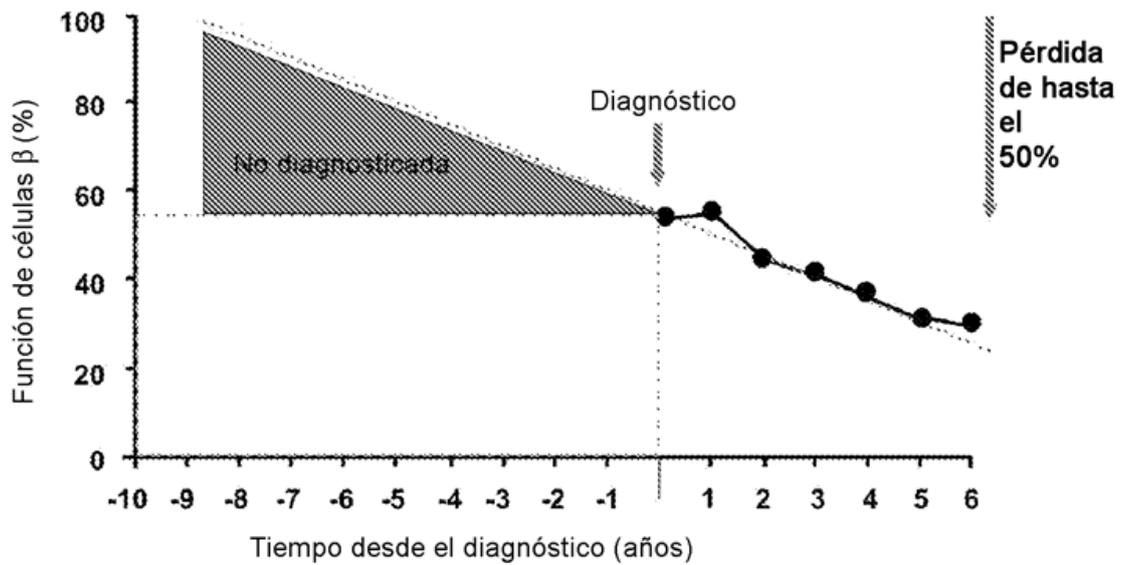


Fig. 9

La resistencia a insulina y la pérdida de función de las células β se produce antes del diagnóstico de DT2



Holman RR. Diabetes Res Clin Prac 1998, 40 (Supl.):S21-S25

Fig. 10