



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

Géraldine Joanny Ordóñez

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

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

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

UNIVERSITAT DE BARCELONA
Facultat de Medicina
Departament de Ciències Clíniques

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

Géraldine Joanny Ordóñez

2011

Programa: Fisiología

Bienio: 2006-2008

Directores: Eduard Montanya y Noèlia Téllez

Hipótesis y Objetivos

El GLP-1 es una potente hormona glucoreguladora producida por las células L enteroendocrinas en respuesta a la ingesta oral. El GLP-1 tiene efectos sobre el páncreas endocrino, el tracto gastrointestinal y el cerebro que lo hacen un potencial agente antidiabético ideal. En el páncreas, GLP-1 actúa a través de un receptor acoplado a proteína G estimulando la secreción de insulina de forma dependiente de glucosa. La principal limitación para su utilización en el tratamiento de la diabetes es su corta vida media, ya que es rápidamente inactivado en sangre por la enzima DPP-4 y eliminado por el aclaramiento renal. Por ello, se han desarrollado una serie de análogos de GLP-1 resistentes a la degradación.

Diversos estudios sugieren que los análogos de GLP-1 tienen la capacidad de aumentar la masa insular estimulando la proliferación y la neogénesis de las células beta e inhibiendo su apoptosis. Sin embargo, mientras que el efecto sobre la función de las células beta está bien establecido, hay una cierta controversia sobre los efectos de la administración de agonistas del receptor del GLP-1 sobre la regeneración y supervivencia de las células beta pancreáticas. Parte de la discrepancia en los estudios realizados puede ser debida a diferencias entre los modelos estudiados, análisis incompletos de los factores que regulan la masa beta, y diferencias metodológicas entre laboratorios. En esta óptica nos propusimos estudiar los efectos de la administración de un nuevo análogo del GLP-1, el NN0027, sobre la neogénesis, replicación y apoptosis de las células beta, y en definitiva sobre la masa beta, en dos modelos animales diferentes, de regeneración celular y de trasplante celular respectivamente, aplicando una metodología y una estrategia de tratamiento similar en ambos.

La hipótesis del trabajo fue que el análogo del GLP-1 NN0027 es capaz de aumentar la masa beta insular *in vivo* estimulando la proliferación y la neogénesis de las células beta e inhibiendo la apoptosis.

El objetivo del estudio fue investigar el efecto del análogo del GLP-1 NN0027 sobre la masa beta *in vivo* y su potencial aplicación en la prevención y en el tratamiento de la diabetes a través de dos estrategias distintas, la regeneración del páncreas endógeno y el trasplante celular.

Hipótesis y Objetivos

Por ello, los objetivos concretos del estudio fueron los siguientes:

1) Estudiar los efectos de la administración del análogo del GLP-1 NN0027 sobre las células beta pancreáticas (masa, neogénesis, replicación y apoptosis) en un modelo de regeneración pancreática, la pancreatectomía parcial.

2) Estudiar los efectos de la administración del análogo del GLP-1 NN0027 sobre las células beta pancreáticas (masa, replicación y apoptosis) en un modelo de terapia celular, el trasplante de islotes.

3) Estudiar los efectos de la administración del análogo del GLP-1 NN0027 sobre la supervivencia de las células beta transplantadas en los primeros días después del trasplante, en los que se produce una pérdida masiva de islotes transplantados.

Materiales y métodos

El estudio de los efectos de la administración del análogo del GLP-1 sobre las células endocrinas de los islotes pancreáticos se llevó a cabo utilizando dos modelos experimentales en los que se inducía la diabetes.

En el primer estudio se utilizó la pancreatectomía subtotal, un modelo de regeneración de las células beta bien conocido y en el segundo el trasplante de islotes en el que era posible ir variando las condiciones experimentales para estudiar la influencia del estado metabólico y de la muerte inducida en los primeros días del trasplante sobre el efecto del GLP-1 sobre los islotes transplantados.

1. Diseño Experimental

1.1 Estudio 1: : Efectos de la administración de un análogo del GLP-1 sobre ratas pancreatectomizadas al 95%

La pancreatectomía del 95% constituye un modelo en el que hay un potente estímulo de regeneración pancreática y un crecimiento de las células beta en el que se estudian los efectos del GLP-1. Las células beta se encuentran en su localización original u ortotópica y están sometidas a estímulos provenientes de otros tipos celulares pancreáticos.

Con el objetivo de analizar los efectos de la administración de un análogo del GLP-1 sobre la regeneración endocrina y en particular sobre el crecimiento y muerte de las células beta pancreáticas se practicaron pancreatectomías subtotales del 95% a ratas que fueron tratadas con el análogo del GLP-1 o con vehículo durante 15 días.

El grupo control estaba formado por ratas con operación control o sham a las que se les practicó una laparotomía media y se les manipuló suavemente el páncreas. Tanto los animales pancreatectomizados como los animales sham fueron monitorizados durante quince días hasta el momento en el que se procedió a la extracción del remanente pancreático o del páncreas para su posterior análisis.

Materiales y métodos

1.2 Estudio 2: Efectos de la administración de un análogo del GLP-1 sobre el trasplante de islotes

Los estudios con islotes transplantados se llevaron a cabo utilizando un modelo de trasplante de islotes singénicos a animales normoglucémicos o hiperglucémicos por una única administración de estreptozotocina. La utilización de animales hiper y normoglucémicos nos permite estudiar los efectos del GLP-1 sobre los islotes transplantados en diferentes situaciones de exposición a la glucosa.

Para estudiar los efectos de la administración del análogo del GLP-1 sobre células beta expuestas a una situación de inflamación se realizó también un estudio en los días inmediatos al trasplante.

El modelo del trasplante nos permite estudiar los efectos del GLP-1 *in vivo* sobre los islotes aislados, a diferencia de la pancreatectomía en la que los efectos sobre otros tipos celulares pancreáticos no se pueden disociar.

El tratamiento se empezó el día del trasplante y finalizó el día de la extracción del injerto. Después de la extracción el animal se monitorizó durante tres-cinco días para comprobar que revertía a la hiperglucemia que presentaba antes del trasplante. En ese período los animales ya no recibían tratamiento.

1.2.1 Estudio 2: Efectos del análogo del GLP-1 sobre el trasplante de islotes a medio plazo

Para comprobar si los potenciales efectos beneficiosos de la administración del GLP-1 sobre los islotes transplantados se traducían en una reducción en el número de islotes necesarios para restablecer la normoglucemia se transplantaron 800 islotes, que constituyen una masa subcrítica para conseguir el restablecimiento de la normoglucemia de animales diabéticos transplantados. La masa subcrítica se define como aquella masa ligeramente inferior a la masa necesaria para restablecer la normoglucemia en animales control y con la que se espera que la mayoría de los animales control del experimento se mantendrán hiperglucémicos mientras que el tratamiento en el grupo tratado permitirá obtener mayor proporción de animales curados.

Por otra parte, para comprobar si los efectos del GLP-1 sobre las células beta transplantadas eran dependientes de glucosa se transplantaron 800 islotes a animales receptores normoglucémicos. En efecto, se ha sugerido que la acción de los análogos del GLP-1 sobre las células beta requiere la presencia de elevadas concentraciones de glucosa (Sturis, Gotfredsen et al. 2003). La comparación de

los efectos de la administración del análogo del GLP-1 sobre los islotes transplantados a receptores diabéticos con los efectos de la administración sobre los islotes transplantados a receptores normoglucémicos nos permitiría establecer la influencia del entorno metabólico sobre las acciones del análogo del GLP-1 sobre las células beta.

Se estudiaron los efectos del análogo del GLP-1 sobre los islotes transplantados en un modelo de trasplante en el que se monitorizó a las ratas transplantadas durante 14 días. Los animales hiperglucémicos o normoglucémicos transplantados eran tratados con el análogo del GLP-1 o bien con el vehículo.

Para descartar posibles efectos del tratamiento sobre el páncreas endógeno de los animales transplantados se estableció un grupo control de animales diabéticos no transplantados y tratados con el análogo del GLP-1 o bien con vehículo.

1.2.2 Estudio 3: : Efectos de la administración de un análogo del GLP-1 en los días inmediatos al trasplante de islotes.

Para describir los efectos de la administración del GLP-1 en los días inmediatos al trasplante se transplantaron 500 islotes a ratas hiperglucémicas y se analizaron los injertos a los tres días.

Es bien conocido que en los primeros días tras el trasplante se produce una pérdida muy importante del tejido transplantado (Davalli, Scaglia et al. 1996; Biarnes, Montolio et al. 2002). Nuestro grupo ha demostrado que en estos días se induce la expresión de varias citoquinas pro-inflamatorias (Montolio, Téllez et al. 2007) y entre ellas de IL-1 β que se ha demostrado tiene un papel clave en el fallo del injerto (Tellez, Montolio et al. 2007). Con este experimento quisimos determinar los efectos de la administración del análogo NN0027 sobre células beta expuestas a un estímulo de muerte importante probablemente debido a la inflamación no específica entre otros factores.

Por otra parte, se usó un modelo de trasplante de una masa beta claramente insuficiente para restablecer la normoglucemia en los receptores diabéticos (500 islotes), con el fin de que tanto el grupo tratado con vehículo como el tratado con el análogo del GLP-1 mantuviesen unos niveles de hiperglucemia similares tras el trasplante aun en el caso de que el análogo del GLP-1 ejerciera una acción beneficiosa sobre los islotes transplantados; dado que está bien establecido que la glucemia del receptor tiene un efecto sobre la replicación, apoptosis y masa beta del injerto (Nacher et al. 1998, Biarnes et al. 2002).

Para ello, se transplantaron animales diabéticos por inyección de STZ con 500 islotes a los que se

Materiales y métodos

inyectó diariamente con el análogo del GLP-1 o bien con vehículo, y se les monitorizó durante tres días. Al final de ese período se procedió a la extracción del injerto para su posterior análisis.

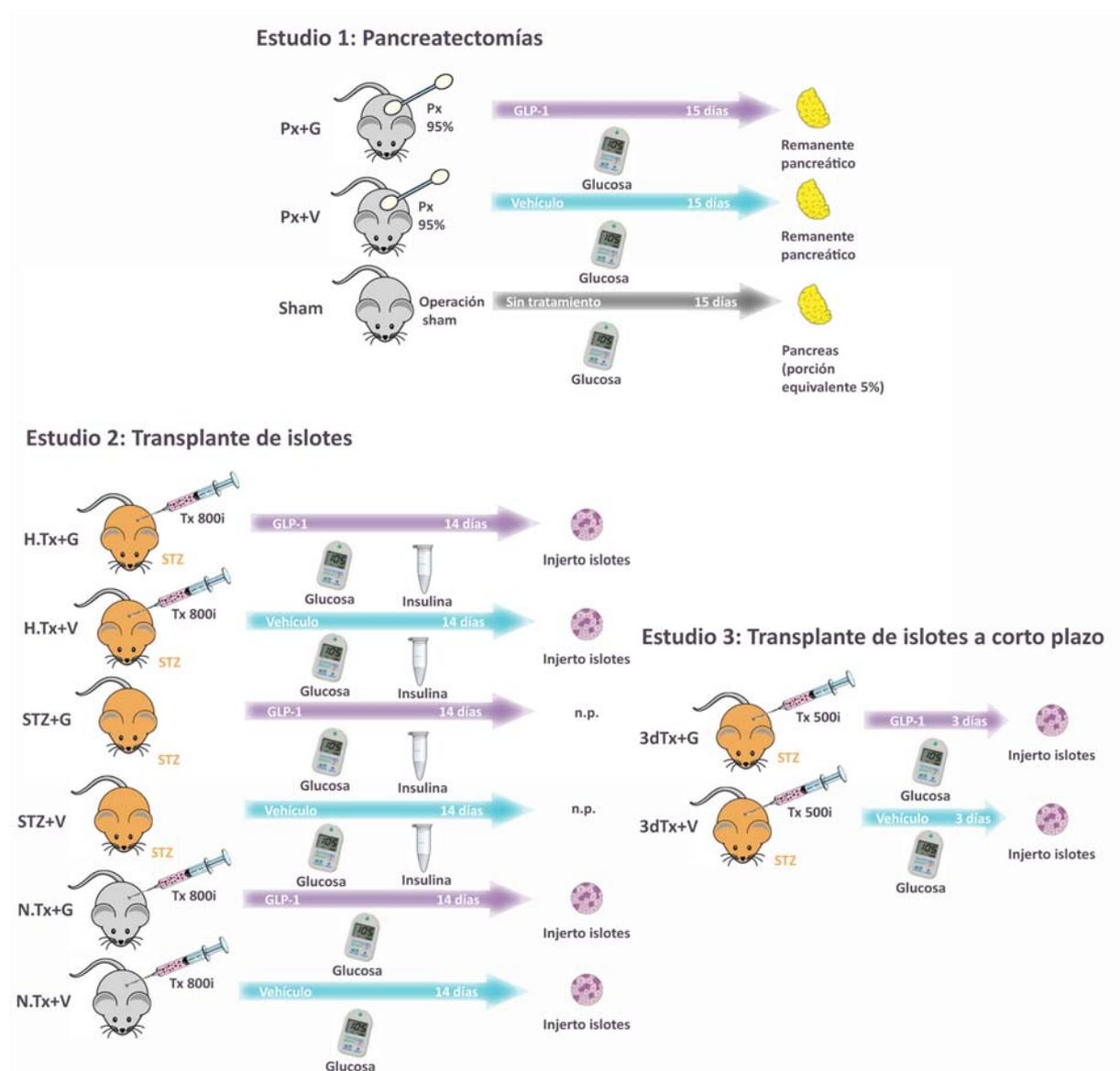


Figura 1: Vista esquemática de los grupos experimentales del estudio. Las ratas grises representan ratas normales y las naranjas ratas diabéticas por STZ. El bastoncillo de algodón representa la pancreatectomía y la jeringa el transplante de islotes. En las flechas está detallada la duración y naturaleza del tratamiento. Las muestras que se obtienen a largo del experimento y al final de este también están representadas. n.p.: no procede (no se obtienen muestras finales de los animales STZ+G y STZ+V).

2. Animales de experimentación

Todos los procedimientos habían sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Barcelona.

Para las pancreatectomías se utilizaron ratas Hsd:Sprague Dawley[®]™ (Harlan Ibérica) de cinco semanas de edad. Para el transplante se utilizaron ratas LEW/Han[™] Hsd (Harlan Ibérica) isogénicas, de

entre 6 i 8 semanas de edad tanto de donantes como de receptores. Esta es una línea animal endogámica, lo que nos permite estudiar el transplante sin inducción de rechazo.

En ambos casos los animales fueron estabulados en las instalaciones de la Universidad de Barcelona del Campus de Bellvitge con control informático de la climatización, ciclos de luz/oscuridad, temperatura y humedad. Los animales tenían libre acceso a agua y pienso en todo momento.

2.1 Inducción de la diabetes por STZ y criterios de curación

La estreptozotocina (STZ) o *N*-(Methylnitrosocarbamoyl)- α -D-glucosamine es una sustancia que produce un efecto citotóxico sobre las células beta de forma bastante específica, por lo que se utiliza para inducir diabetes en modelos experimentales. Su estructura química incluye una molécula de glucosa y un centro activo de nitrosurea, que le confiere toxicidad. Se ha demostrado que penetra en las células beta a través del transportador de glucosa GLUT-2 (Schnedl, Ferber et al. 1994). Una vez dentro de la célula la STZ ocasiona la muerte de las células por un mecanismo similar al de las especies reactivas de oxígeno y el óxido nítrico. La STZ induce cortes en el DNA lo que provoca que se active el enzima de reparación del DNA Poly (ADP ribosa) polimerasa (PARP)(Yamamoto, Uchigata et al. 1981). La PARP es un enzima muy abundante en la células que utiliza NAD^+ como sustrato. La activación prolongada del enzima causa un rápido agotamiento del NAD^+ celular. En consecuencia las reservas de ATP celular también se agotan al intentar suplir el NAD^+ , lo que acaba resultando en la muerte de la célula (Charron and Bonner-Weir 1999).

Los animales receptores del transplante recibieron una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (Sigma) de 65mg/kg disuelta en tampón citrato. Antes del transplante la inducción de diabetes se confirmó por la presencia de hiperglucemia (glucosa plasmática superior a 360 mg/dl) en dos medidas consecutivas. El transplante de islotes se llevó a cabo alrededor de 14 días después de la inyección de STZ.

Se suele considerar que los animales transplantados se curan cuando consiguen restablecer glucemias en condiciones post-prandiales menores o iguales a 180 mg/dL durante al menos dos medidas consecutivas. Es el criterio para determinar la curación que se siguió.

En contraposición a estos estarían los animales no curados o hiperglucémicos con valores superiores a 180 mg/dL. Sin embargo, dentro de los animales no curados se puede definir un grupo de animales con una hiperglucemia intermedia (glucemia > 180 mg/dL y < 360 mg/dl) en los que el injerto presenta una función parcial capaz de reducir la hiperglucemia pero no de normalizarla (Sharma, Sörenby et al. 2006). La suma de los animales curados (glucosa < 180 mg/dL) y animales con función

Materiales y métodos

parcial del injerto ($180 \text{ mg/dL} < \text{glucemia} < 360 \text{ mg/dL}$) indica el número total de animales con injerto funcionando. En los animales que presentan glucemias medias por encima de 360 mg/dL consideramos que ha habido fracaso primario del injerto.

2.2. Determinación de glucemia, peso e insulina plasmática

El peso y la glucemia de los animales se determinaron entre las 9 y las 11h de la mañana en condiciones de no ayuno. La sangre se obtuvo por un pequeño pinchazo en la cola del animal y se midió la glucemia con un glucómetro portátil (Glucocard Memory A, Menarini).

En el caso de las ratas parcialmente pancreatectomizadas se determinaron glucemia y peso los días 0, 3, 7, 10, 14 y 15 después de la cirugía.

En los animales transplantados la glucemia se midió el día de la inyección de la STZ y posteriormente los días 3, 7, 14 para comprobar la aparición de diabetes. Tras el día del trasplante, la glucosa plasmática se determinó los días 3, 7, 10 y 14 y finalmente 3-5 días después de la extracción del injerto.

La insulina plasmática se determinó el día del trasplante y los días, 7 y 14 después del trasplante en los animales hiperglucémicos transplantados. En el mismo momento en que se medía la glucemia de las ratas se recogió un volumen de aproximadamente $300\mu\text{l}$ de sangre capilar de la cola en un tubo-capilar (Microvette CB 300, Sarstedt) que contenía una solución anticoagulante (Potasio-EDTA K2E). Los tubos de sangre se centrifugaron 10 minutos a 4°C a 5000rpm para separar el plasma, que se recogió en tubos nuevos.

La concentración de insulina en plasma se determinó con un ensayo comercial ELISA Ultrasensible de insulina de rata (ELISA Insulin Ultrasensitive, Mercodia AB, Uppsala, Suecia). Se siguieron las instrucciones del fabricante para el ensayo de $50\mu\text{l}$ de muestra, en el que la sensibilidad del ensayo se sitúa entre $0,02 \mu\text{g}$ y $1 \mu\text{g}$ de insulina por litro.

La absorbancia de las muestras se midió utilizando el programa informático Genesis 2.0 (Labsystems, Albertville, MI, USA) y un lector de placas de longitud de onda 450 nm .

Es importante tener en cuenta que el aparato de medida de la glucemia (Glucocard) tiene como valor máximo de detección 600mg/dL . Las medidas a las que hemos adjudicado 600mg/dL podían en realidad presentar niveles mucho más elevados. En el cálculo del cociente insulina/glucosa se utilizan también estos valores y por tanto es probable que alguno de los datos debiera ser menor, sobretodo en los grupos de animales no transplantados donde la proporción de animales con

glucemias por encima de 600mg/dL es mucho mayor.

2.3 Administración de productos

2.3.1 Vehículo

La solución en la que se resuspendió el análogo del GLP-1 fue una solución salina fosfatada tamponada a pH=7,4 y filtrada para asegurar su esterilidad. Esta misma solución es la que se utilizó en los grupos control, inyectados diariamente con un volumen de vehículo equivalente al del fármaco.

2.3.2 NN0027

El análogo del GLP-1 humano que se utilizó, NN0027, presenta una modificación química que permite su unión a la albúmina. Es una cadena de ácidos grasos que permite a la molécula unirse a la albúmina circulante o presente en los tejidos subcutáneos. La forma activa de GLP-1 se va liberando entonces de forma continuada de las moléculas de albúmina. Además, la unión con la albúmina también reduce la velocidad de degradación y de eliminación renal. El fármaco fue proporcionado por Novo Nordisk.

Tanto el análogo del GLP-1 (NN0027) como el vehículo fueron administrados por inyección subcutánea, una vez al día, inmediatamente después de la determinación de la glucosa. Se puso especial atención en que la hora de inyección del fármaco fuera siempre la misma. La dosis de fármaco que se utilizó era de 100µg/kg/día, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La duración del tratamiento fue de 15 días en el caso de los animales pancreatectomizados, es decir que recibieron una inyección al día desde el día de la pancreatectomía hasta que fueron sacrificados. En el caso de los animales transplantados el tratamiento se inició la mañana del día en el que iban a ser transplantados y finalizó el día de la extracción del injerto (lo que corresponde al día 3 o día 14 tras el trasplante según el estudio).

3. Procedimientos quirúrgicos

3.1 Pancreatectomía

La pancreatectomía subtotal del 95% consiste en la eliminación de la mayoría del tejido pancreático excepto un 5% del órgano, que se corresponde con la porción anatómica situada entre el colédoco y la primera parte del duodeno (procedimiento de Foglia (Foglia 1944)). Las ratas fueron anestesiadas con 5% de isoflurano (Forane®, ABBOT, España) inhalado para el procedimiento

Materiales y métodos

quirúrgico; se les practicó una laparotomía media y se expuso el páncreas. El 95% del tejido pancreático se fue rasgando delicadamente con un bastoncillo de algodón estéril preservando los principales vasos sanguíneos. La porción pancreática correspondiente al 5% que se dejó intacta corresponde a la región situada entre el colédoco y el duodeno en su porción más cercana (Bonner-Weir, Trent et al. 1983). La pequeña porción de páncreas que queda adherida al píloro también se eliminó.

Las ratas pancreatectomizadas se trataron con el antiinflamatorio no-esteroideo meloxicam (Metacam®,Boehringer Ingelheim, Alemania) los tres días posteriores a la cirugía, una vez al día por inyección subcutánea. La dosis utilizada fue de 2.5 mg/kg/24h.

3.2 Aislamiento de islotes

Los islotes se aislaron por digestión con colagenasa P (Roche). Bajo anestesia con una mezcla de ketamina (75 mg/kg), diazepam (5mg/kg) y atropina (0,05mg/kg) se practicó una laparotomía media y se expuso el páncreas del animal. Después de localizar el colédoco pancreático, éste se obstruyó a nivel de la ampolla de Vater utilizando una seda quirúrgica. A continuación se sacrificó el animal por exanguinación. El colédoco se canuló entonces distalmente utilizando un tubo de plástico flexible conectado a una jeringa de 10 mL y se inyectaron 7 ml de solución de colagenasa a la concentración de 2mg/ml disuelta en medio de cultivo M-199 (Sigma). Se diseccionó el páncreas del resto de tejidos y se incubó en un baño a 37°C durante unos 12 minutos. La digestión se detuvo al añadir M-199 frío y seguidamente el digerido se lavó tres veces con medio M-199 y se pasó por un filtro de 400 µm para eliminar restos de tejido no digerido. Los islotes se purificaron entonces del resto gracias a un gradiente de densidad utilizando Histopaque 1077 (Sigma) por centrifugación a 2300 rpm, 15 minutos a 4°C. Los islotes se recuperaron de la interfase y se lavaron de nuevo tres veces con medio M-199 suplementado al 10% con suero bovino fetal.

Los islotes aislados se pescaron a mano con una pipeta automática bajo un estereomicroscopio 2 o 3 veces hasta la obtención de una preparación pura de islotes. Solamente los islotes de diámetro comprendido entre 75 y 250 µm fueron seleccionados.

3.3 Transplante de islotes

Los islotes aislados se distribuyeron en grupos de 500 o 800 islotes que se recogieron con una punta de pipeta de 200 µl y se traspasaron a un tubo de polietileno PE-50 (Smiths) con la ayuda de una jeringa Hamilton de 1 ml (Hamilton). El tubo se centrifugó a 600 rpm durante unos segundos para agrupar los islotes.

Las ratas receptoras se anestesiaron con isoflurano y se realizó una incisión lumbar para exponer el riñón izquierdo. Se practicó una pequeña incisión en la cápsula en el polo inferior del riñón por donde se introdujo el tubo con los islotes. Con la ayuda de la jeringa Hamilton los islotes se inyectaron bajo la cápsula renal del polo superior del riñón. La capsulectomía se cerró con un cauterizador de baja temperatura (AB Médica SA, España) y la herida lumbar se suturó después de la cirugía.

3.4 Recuperación de las muestras de tejido

3.4.1 Pancreatectomía

Con el animal anestesiado con isofluorano se realizó una laparotomía media para exponer el remanente pancreático. El animal se sacrificó por exanguinación para obtener un tejido totalmente limpio de sangre y se procedió a diseccionar el remanente del resto de los tejidos. De forma similar se extrajeron los páncreas normales de ratas Lewis control. En el caso de los animales Sham solamente el 5% del páncreas era extraído, el equivalente al 5% remanente después de la pancreatectomía subtotal.

3.4.2 Transplante de islotes

Con el animal anestesiado se expuso el riñón y la parte de cápsula renal que rodea al injerto se recortó para su extracción junto con el injerto, aprovechando la adhesión de los islotes transplantados a la capsula renal. Este proceso se llevó a cabo bajo un estereomicroscopio para asegurarse de que se recuperaba todo el tejido transplantado. Para finalizar se practicó una nefrectomía lo que permite asegurar que una vez acabado el proceso es imposible que pueda quedar tejido insular transplantado en el animal.

En los experimentos de transplante de ratas diabéticas a 14 días las muestras histológicas solamente se extrajeron de un subconjunto de los animales transplantados que habían sido designados previamente al inicio del experimento. Los animales de los que se extrajeron los injertos de islotes eran representativos de la totalidad (Tabla 1).

Materiales y métodos

	H.Tx+G		H.Tx+V	
	Injertos totales	Injertos procesados para histología	Injertos totales	Injertos procesados para histología
n	18	10	15	8
Glucemia día 14 (mg/dL)	336 ± 40,1	366 ± 50,9	407 ± 38,3	432 ± 44,6
Peso día 14 (g)	227 ± 4,3	230 ± 5,2	223 ± 5,0	225 ± 8,7
Función del injerto (%)	44	30	27	25

Tabla 1 : Parámetros metabólicos de todas las ratas diabéticas por STZ transplantadas con 800 islotes y tratadas durante 14 días con el análogo del GLP-1 (H.Tx+G) o con el vehículo (H.Tx+V) y de las que se procesaron sus injertos para histología. Los valores corresponden a la media ± error estándar.

3.5 Fijación e inclusión de las muestras

Inmediatamente después de la extracción tanto los remanentes como los injertos se fijaron en paraformaldehído al 4% (PFA) durante 20-24 horas. Al día siguiente se determinó el peso del remanente pancreático o del injerto en una balanza de precisión tras eliminar todo exceso de fijador por capilaridad. Antes de la inclusión en parafina el tejido se deshidrató con una serie de baños de alcoholes de concentración creciente hasta el xileno (Montanya and Téllez 2009).

4. Inmunohistoquímica

Para las tinciones por inmunohistoquímica se utilizaron cortes de 2-3 μ m de espesor de las piezas fijadas en PFA 4% e incluidas en parafina.

En el caso de la replicación las secciones se tiñeron por BrdU y por insulina y en caso de la apoptosis por TUNEL y por insulina. Para la determinación del tamaño y la masa de las células beta se utilizaron las piezas teñidas utilizadas para determinar la replicación. Para determinar la vascularización de los islotes se utilizó la lectina BS-1, que marca los vasos, y los islotes se tiñeron con un cóctel de anticuerpos anti-insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático.

4.1 Replicación de las células beta

Las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente con el análogo de la timidina 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU) (Sigma) 6 horas antes de la extracción del remanente pancreático a la dosis de 100 mg/kg de peso corporal. La BrdU es un análogo de la timidina que se incorpora en el DNA de las células que se encuentran en la fase S de replicación (de aproximadamente 6 horas de duración en células beta)(Montaña, Bonner-Weir et al. 1993). El marcaje por BrdU identifica a las células que ya han pasado por el "check-point" G1-S y por lo tanto ya van a replicarse. Para la detección de la BrdU se utilizó el kit comercial Cell Proliferation kit (GE HealthCare, UK).

Las secciones de tejido se desparafinaron y luego se incubaron con una solución al 3% de agua oxigenada durante 20 minutos para inhibir la actividad de las peroxidasas endógenas. Para desnaturalizar y estabilizar el DNA las preparaciones se sumergieron en 2N HCL durante 5 minutos seguido de un lavado en solución 0,1M de borato de 10 minutos. A continuación se bloquearon las uniones inespecíficas con una solución de bloqueo con suero de caballo al 5% y se procedió al marcaje para BrdU que se hizo siguiendo las instrucciones del kit. El sustrato para la visualización fue 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) junto con un intensificador que contenía cloruro de níquel y de cobalto (DAB-níquel), lo que permitía la obtención de un precipitado de color más intenso que la DAB normal. El resultado fueron unos núcleos casi negros.

A continuación las secciones se tiñeron por insulina con un anticuerpo primario de conejo (1:50)(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

Después de la tinción de los núcleos que estaban replicando, las secciones se bloquearon en una solución con suero de caballo al 5% durante 15 minutos y se incubaron a 4°C durante una noche con el anticuerpo primario anti-insulina. Al día siguiente las preparaciones se lavaron y se aplicó el anticuerpo secundario anti-Ig G de conejo (SAR - Dako) diluido 1/200 durante 3 horas. Después de volver a lavar las preparaciones se incubaron con el anticuerpo terciario PAP diluido 1/500 durante 1 hora. La tinción se visualizó con DAB. Para finalizar las preparaciones se lavaron en abundante agua destilada, se contratiñeron con Hematoxilina de Harris, deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol y montaron con el medio de montaje DPX.

Las células y los núcleos marcados por BrdU se contaron usando un microscopio Olympus BX51 conectado a una cámara de video en un monitor en color. Se determinó el número de total de células insulina positivas y el número de células insulina positivas también marcadas con BrdU. Se contaron como mínimo 1200 células para cada pieza. El resultado se expresó como el porcentaje de núcleos BrdU respecto a las células beta positivas. Se contaron todas las células beta de cada sección

Materiales y métodos

y se añadieron nuevas secciones de la misma pieza cuando fue necesario para alcanzar el número mínimo requerido de células evaluadas.

La replicación de las células beta en estado basal se determinó en los páncreas de los animales sham en el caso de las pancreatectomías y en el caso del trasplante de islotes en los páncreas de cuatro ratas Lewis control de la misma edad que las utilizadas como donantes de islotes.

4.2 Apoptosis de las células beta

Las secciones de tejido se desparafinaron y se tiñeron con inmunoperoxidasa visualizada por DAB-níquel, en el caso de los núcleos apoptóticos, por la técnica del TUNEL (TdT- mediated dUTP Nick End Labelling) y por inmunoperoxidasa visualizada por DAB para las células beta.

Durante el proceso de apoptosis se producen cortes internucleosomales del DNA que producen extremos 3'-OH. La técnica del TUNEL se basa en la transferencia enzimática (por el dTT) de nucleótidos marcados con digoxigenina a los extremos 3'-OH del DNA. Después se une un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con la peroxidasa. Esta técnica nos permitió obtener una tinción específica de los núcleos apoptóticos, que se diferenciaban de los demás por estar teñidos y condensados.

Para la tinción por TUNEL se utilizó el kit comercial In Situ Cell Death Detection Kit ApopTag (Intergene, Oxford, UK) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Previamente a la utilización del kit las secciones desparafinadas se incubaron en una solución al 3% de agua oxigenada durante 20 minutos para inhibir la actividad de las peroxidasas endógenas seguido de una digestión de 15 minutos con proteinasa k (Sigma) para favorecer la exposición del antígeno. Para la visualización del TUNEL se añadió el sustrato de la peroxidasa DAB níquel.

Posteriormente, las secciones se tiñeron por insulina como se ha descrito anteriormente. Las secciones teñidas se contratiñeron con Hematoxilina de Harris (Sigma) para su visualización a través de un microscopio óptico conectado a un monitor en color.

La apoptosis de las células beta se expresó como porcentaje de células beta que eran positivas por TUNEL. Se contaron un mínimo de 1200 células beta para cada páncreas, remanente pancreático o injerto.

4.3 Área individual de las células beta

La cuantificación del área media de las células beta nos permite estimar el tamaño individual de las células beta y por lo tanto estudiar la hipertrofia de las células beta en nuestro tejido (Biarnés, Montolio et al. 2002). Para obtener el área individual de las células beta, el área celular beta de los

islotes se determinó con un programa de análisis de imagen (Analysis 3.0; Soft Imaging System, Münster, Germany). Para ello se trazó cuidadosamente el contorno de los islotes en un área del páncreas, remanente pancreático o injerto, eliminando las zonas que no correspondían a células beta y el programa nos calculaba el área. Se contaron entonces los núcleos beta que se encontraban en la región contorneada y se dividió el área en μm^2 por el número de núcleos para obtener el área media de una célula. Para la cuantificación se midieron al menos 300 células beta de al menos 6 islotes diferentes por cada pieza.

4.4 Masa de células beta

La masa de células beta o masa beta se determinó por morfometría por conteo de puntos (Weibel 1979). De manera breve, las secciones teñidas por insulina se visualizaron en un monitor a color con una planilla de 48 puntos equidistantes superpuesta y se determinó el número de puntos que interceptaban células beta. El volumen relativo de células beta se determinó dividiendo el número de puntos que interceptaban células beta por el número total de puntos contados en el tejido.

El número de puntos o interceptos que debían ser contados se determinó con la ayuda de un nomograma (Weibel 1979) que relaciona el volumen relativo del tipo celular de interés con el error estándar esperado y el número de puntos contados. En nuestras determinaciones se estableció el número mínimo de interceptos que debían ser contados para que el error cometido siempre fuera inferior al 10%.

El volumen relativo de células beta multiplicado por el peso del remanente (obtenido inmediatamente después de la fijación como se ha descrito previamente) nos permitió calcular la masa de células beta del remanente, asumiendo que el peso de 1 cm^3 de tejido es de 1 gramo (Weibel 1979).

La masa de células beta inicialmente transplantada se determinó en grupos de 800 ($n=4$) o 500 islotes ($n=3$). Después del aislamiento los grupos de islotes se lavaron en PBS y se fijaron en forma de pellets de islotes en PFA 4%. El exceso de paraformaldehído se eliminó por capilaridad y se pesaron siguiendo el mismo proceso que los injertos. La masa de células beta inicialmente transplantada se determinó multiplicando el peso de los pellets de islotes por el volumen relativo de células beta (determinado por el programa de análisis de imagen Analysis 3.0, de forma similar a la descrita en el apartado 8.3).

Materiales y métodos

4.5 Neogénesis de células beta

Hipotetizamos que en el proceso de regeneración pancreática que tiene lugar después de la pancreatectomía subtotal pueden aparecer nuevas células beta (por neogénesis a partir de precursores pancreáticos o bien por transdiferenciación del tejido acinar) que formarían pequeñas agrupaciones de células beta, visualmente bien diferenciadas de los islotes (preexistentes). La presencia de pequeñas agrupaciones de células insulina positivas ha sido considerada como una indicación indirecta de neogénesis de células beta (Montanya and Téllez 2009).

Para cuantificar la neogénesis en un remanente pancreático se contaron el número células que formaban parte de pequeñas agrupaciones de células beta (menos de cinco células) por milímetro cuadrado de tejido pancreático. Se contaron entre dos y tres secciones de cada remanente pancreático para obtener una medida representativa.

De forma complementaria se cuantificó la asociación de las células insulina positivas con los ductos pancreáticos, otro indicador indirecto de neogénesis (Montanya and Téllez 2009). Se considera que las células insulares que brotan de los ductos deben estar en contacto o muy cercanas a los ductos pancreáticos (a menos de cinco células de distancia).

Se determinó en secciones teñidas por insulina el número de islotes situados a menos de cinco células de distancia de los ductos (islotes periductales) y de forma independiente el número de islotes más alejados de estos (islotes extraductales). Para obtener un resultado representativo se analizaron de dos a tres secciones – alejadas de al menos 150 μm entre ellas -de cada páncreas . Los resultados se expresaron como porcentaje de islotes periductales o extraductales.

4.6 Vascularización de los islotes

Las células endoteliales de los remanentes pancreáticos se marcaron con la lectina *Bandeiraea simplicifolia* (también llamada *Griffonia simplicifolia* o BS-1). Esta lectina tiene afinidad por los residuos α -D-galactosyl terminales, presentes en las células endoteliales (Laitinen 1987). A diferencia de otros marcadores como CD31 que se unen a las células endoteliales aunque no estén organizadas en un vaso sanguíneo con lumen, las lectinas como BS-1 solamente marcan vasos funcionales (Figg and Folkman 2008).

Para marcar los vasos sanguíneos en las secciones de remanentes pancreáticos y páncreas en primer lugar se desparafinaron y a continuación se hirvieron en tampón citrato durante 20 minutos para favorecer la exposición de los antígenos. Después de inhibir las peroxidasas endógenas como descrito anteriormente se aplicó un tratamiento con Neuraminidasa (aislada de *Clostridium perfringens*) (Sigma) a 0,1U/ml a 37°C durante una hora. La digestión enzimática con neuraminidasa

eliminaba el ácido siálico de las cadenas carbonatadas de los glycoconjugados facilitando la exposición de residuos glucídicos a los que potencialmente se une la lectina. Después de un lavado en solución de TRIS las secciones se bloquearon en solución de bloqueo (suero de caballo al 5%) durante una hora a temperatura ambiente e incubaron con la lectina BS-1 (marcada con biotina), a la dilución final de 1:20 en una solución 1M de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0,1% albúmina de suero bovino (BSA) durante la noche. Al día siguiente las secciones se incubaron con estreptavidina-HRP (Sigma) diluida 1/500 durante 15 minutos a temperatura ambiente y se procedió a visualizar con DAB-Niquel. A continuación las secciones se marcaron para las hormonas insulares. Se hizo una mezcla de anticuerpos de conejo anti-insulina (1:50), anti-glucagón (1:500, Dako), anti-somatostatina (1:250, Dako) y anti-PP (1:2000, Chemicon International). Las células positivas se visualizaron como previamente se ha descrito para la insulina con el sistema SAR-PAP y DAB normal. Para cuantificar la vascularización se determinó con el programa de análisis de imagen (Analysis 3.0) el área celular ocupada por vasos, por islotes y total. También se contó el número de vasos por islotes. De ahí se infirió la densidad vascular (área vasos/área total), el tamaño vasos (área total vascular/ n° total de vasos) y el número de vasos por islote.

5. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como medias \pm error estándar. Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático SPSS 14.0 para Windows. Las comparaciones múltiples entre medias se evaluaron con análisis por ANOVA. Si el ANOVA detectaba diferencias significativas se utilizó el método DMS para determinar las diferencias específicas entre los grupos. En el caso de que las varianzas de las muestras no fueran homogéneas, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis que es la alternativa no paramétrica del ANOVA. La prueba Kruskal-Wallis también evalúa si las muestras cuantitativas pertenecen a la misma población pero detecta diferencias entre las medianas de los grupos. En el caso de las diferencias detectadas por el método de Kruskal-Wallis se utilizó el método de Mann-Whitney para caracterizar las diferencias entre los grupos experimentales. En el caso de la replicación de las células beta las diferencias se evaluaron por el test t de Student. Los porcentajes de animales curados y de función parcial se compararon por el test de chi-cuadrado.

En el caso de las curvas de supervivencia utilizadas para comparar el momento de curación y el número de animales curados entre los diferentes grupos el análisis estadístico se hizo con el programa Graph Pad Prism v4 (Graph Pad Software). Las curvas se trazaron por el método de Kaplan y Meir y se compararon por el test log-rank.

La significación estadística se estableció en $p < 0.05$.

6. Referencias Bibliográficas

- Biarnes, M., M. Montolio, et al. (2002). "Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia." *Diabetes* **51**(1): 66-72.
- Biarnés, M., M. Montolio, et al. (2002). "Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia." *Diabetes* **51**(1): 66-72.
- Bonner-Weir, S., D. F. Trent, et al. (1983). "Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release." *J.Clin.Invest* **71**(6): 1544-1553.
- Charron, M. and S. Bonner-Weir (1999). "Implicating PARP and NAD⁺ depletion in type I diabetes." *Nat Med* **5**(3): 269-270.
- Davalli, A., L. Scaglia, et al. (1996). "Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period. Dynamic changes in structure and function." *Diabetes* **45**(9): 1161-1167.
- Figg, W. D. and J. Folkman (2008). *Angiogenesis: An Integrative Approach from Science to Medicine*, Springer Science.
- Foglia, V. (1944). "Características de la diabetes en la rata." *Revista de la sociedad argentina de biología* **20**: 21-37.
- Laitinen, L. (1987). "Griffonia simplicifolia lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues." *Histochem J* **19**(4): 225-234.
- Montanya, E. and N. Téllez (2009). "Pancreatic remodeling: Beta-cell apoptosis, proliferation and neogenesis, and the measurement of Beta-cell mass and of individual Beta-cell size." *Methods Mol Biol* **560**: 137-158.
- Montaña, E., S. Bonner-Weir, et al. (1993). "Beta cell mass and growth after syngeneic islet cell transplantation in normal and streptozocin diabetic C57BL/6 mice." *J Clin Invest* **91**(3): 780-787.
- Montolio, M., N. Téllez, et al. (2007). "Role of blood glucose in cytokine gene expression in early syngeneic islet transplantation." *Cell Transplant* **16**(5): 517-525.
- Schnedl, W., S. Ferber, et al. (1994). "STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells." *Diabetes* **43**(11): 1326-1333.
- Sharma, A., A. Sörenby, et al. (2006). "Exendin-4 treatment improves metabolic control after rat islet transplantation to athymic mice with streptozotocin-induced diabetes." *Diabetologia* **49**(6): 1247-1253.
- Sturis, J., C. F. Gotfredsen, et al. (2003). "GLP-1 derivative liraglutide in rats with beta-cell deficiencies: influence of metabolic state on beta-cell mass dynamics." *Br.J.Pharmacol.* **140**(1): 123-132.

Tellez, N., M. Montolio, et al. (2007). "Adenoviral overproduction of interleukin-1 receptor antagonist increases beta cell replication and mass in syngeneically transplanted islets, and improves metabolic outcome." Diabetologia **50**(3): 602-611.

Weibel, E. R. (1979). Stereological methods. Practical Methods for Biological Morphometry, vol 1. London, Academic: 101-161.

Yamamoto, H., Y. Uchigata, et al. (1981). "Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets." Nature **294**(5838): 284-286.