

1044

TESIS DOCTORAL

**ONTOGÉNESIS Y EVOLUCIÓN DE LA MASA DE CÉLULAS INGAP
(ISLET NEOGENESIS ASSOCIATED PROTEIN)POSITIVAS
EN EL PERÍODO INTRAUTERINO Y EN ADULTOS CON
INSULINORRESISTENCIA FISIOLÓGICA (RATAS PREÑADAS)**

AUTOR: VIVIANA MADRID

DIRECTOR: HÉCTOR DEL ZOTTO
CO-DIRECTOR: SUSANA MARÍA MOSCA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO
2009



BIBLIOTECA
Florencia Ameghino

*A mis padres por sostenerme
en cada momento de mi vida.*

Los amo.

Estos agradecimientos significan haber concluido un intenso trabajo que no hubiera sido posible sin el apoyo y la colaboración de muchas personas a las cuales hoy quiero expresar mi reconocimiento:

A mis padres, a mi hermana y a Carlí por acompañarme y alentarme cuando todo parecía imposible; por su amor incondicional y porque gracias a ellos éste y otros momentos de mi vida tienen sentido.

A mis amigas que me acompañaron e impulsaron como siempre. Las quiero.

Al Dr. Juan José Gagliardino, por brindarme la posibilidad de realizar este trabajo de tesis y en particular un profundo reconocimiento a su dedicación y esfuerzo en la etapa final de esta tesis.

Al Dr. Héctor Del Zotto, por conducirme y acompañarme en esta tesis y fundamentalmente por transmitirme su interés por la morfología.

Al Doctor Luis Flores y a la Bioq. María Agustina Raschia, mi profundo agradecimiento por su inestimable y desinteresada contribución, que implicó tiempo, experiencia y dedicación, priorizando este trabajo sobre el propio.

A los Doctores Inés Borelli y Bárbara Maiztegui, por su colaboración y apoyo permanente y generoso.

A la Dra. Susana Mosca por sus valiosos consejos y sugerencias en esta tesis.

Al Técnico Principal César Bianchi por su fundamental y constante asistencia técnica, por su generosidad y por las charlas compartidas.

A nuestros bioteristas, Adrián y Adriana por su colaboración en el manejo de los animales.

A la Traductora Adriana Di Maggio por sus sugerencias y contribución en la diagramación de esta tesis y por su total predisposición y entusiasmo.

A todos y cada uno de mis compañeros del CENEXA porque, con su pequeño o gran aporte, hicieron posible la realización de esta tesis.

A mis compañeros de la cátedra de Biología, por su comprensión y apoyo.

Al CONICET y a la ANCyPT, por el soporte económico brindado a través de las correspondientes becas que me permitieron dedicarme en forma exclusiva al desarrollo de este trabajo de tesis.

INDICE

1. RESUMEN	1-3
2. ABSTRACT	4-6
3. INTRODUCCIÓN	7-24
3.1 El Páncreas. Histología insular	7
3.2 Fisiología del páncreas endócrino	8
3.2.1 Biosíntesis de la insulina	8
3.2.2 Estímulos para la secreción de insulina	10
3.2.3 Efecto de la insulina sobre los tejidos periféricos	11
3.2.4 Mecanismo de acción de la insulina	12
3.2.5 Insulinorresistencia y diabetes tipo 2	12
3.2.6 Insulinorresistencia fisiológica y diabetes gestacional	14
3.2.7 Cambios metabólicos y morfológicos en la diabetes gestacional	14
3.3 Embriología del páncreas	14
3.3.1 Crecimiento del páncreas en el período fetal, neonatal y adulto	17
3.3.2 Hormonas placentarias y compensación de la masa β	18
3.3.3 Regulación de la masa de células β por factores de crecimiento	19
3.3.4 INGAP: Proteína Asociada a la Neogénesis Insular	21
3.4 Objetivos de la tesis	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS	25-34
4.1 Animales	25
4.1.1 Mantenimiento de los animales	25
4.1.2 Grupos experimentales	25
4.1.3 Sacrificio y obtención de muestras	26
4.2 Determinación de glucemias e insulinemias	26
4.2.1 Cálculo de índices HOMA β e insulinorresistencia	26
4.3 Secreción de insulina	27
4.4 Contenido de insulina	27
4.5 RT-PCR cuantitativa en tiempo real	27
4.5.1 Aislamiento del ARN total	27
4.5.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc)	28
4.5.3 Diseño de los cebadores	28
4.5.4 Secuenciación de un fragmento de ADN	29
4.5.5 PCR en tiempo real	30

4.6 Inmunohistoquímica	
4.6.1 Procesamiento del material	31
4.6.2 Desparafinado	31
4.6.3 Coloraciones	31
4.6.4 Análisis morfométrico	33
4.7 Análisis estadístico	34
5. RESULTADOS	35-66
5.1 Fetos y recién nacidos	35
5.1.1 Animales	35
5.1.2 Datos bioquímicos	35
5.1.3 Secreción de insulina <i>in vitro</i>	36
5.1.4 Expresión génica	37
5.1.5 Estudios morfológicos y morfométricos	42
5.1.5.1 Morfología general de los páncreas	42
5.1.5.2 Ontogenia del INGAP	42
5.1.5.3 Morfología insular	43
5.1.5.4 Masa de células insulares y células β extrainsulares	45
5.1.5.5 Replicación de células β	47
5.1.5.6 Marcadores de diferenciación endócrina	48
5.1.5.7 Marcadores de neogénesis insular	49
5.1.5.8 Apoptosis	51
5.2 Ratas adultas normales control y preñadas	53
5.2.1 Animales	53
5.2.2 Consumo diario de agua y alimento sólido	53
5.2.3 Parámetros séricos	54
5.2.4 Contenido de insulina pancreática y secreción de insulina <i>in vitro</i>	55
5.2.5 Datos morfométricos	56
5.2.5.1 Morfometría insular	56
5.2.5.2 Masa de células insulares y células β extrainsulares	58
5.2.5.3 Replicación de células β	60
5.2.5.4 Marcadores de diferenciación endócrina	61
5.2.5.5 Marcadores de neogénesis insular	63
5.2.5.6 Apoptosis	65
6. DISCUSIÓN	67-73
6.1 Fetos y recién nacidos	67

6.1.1 Experimentos <i>in vivo</i>	67
6.1.2 Experimentos <i>in vitro</i>	70
6.2 Ratas adultas normales controles y preñadas	71
6.2.1 Experimentos <i>in vivo</i>	71
6.2.2 Experimentos <i>in vitro</i>	72
7. CONCLUSIONES	74
8. BIBLIOGRAFÍA	75-89

RESUMEN

1. RESUMEN

La preñez se acompaña normalmente de una insulinoresistencia (IR) progresiva que comienza a mediados del período de gestación y progresa a través del tercer tercio de la preñez. Como consecuencia se produce un incremento y/o hipertrofia de la célula β y un incremento de la secreción de insulina para compensar esta IR fisiológica.

Diferentes hormonas, genes, sustratos metabólicos y factores de crecimiento están involucrados en el control del crecimiento y desarrollo de la masa de células β , entre ellos la Proteína Asociada al Crecimiento y Neogénesis Insular (INGAP). El INGAP fue aislado inicialmente del páncreas de hámster y posteriormente clonado. En la rata, su presencia en el páncreas sólo ha sido identificada por técnicas inmunocitoquímicas. Actualmente se acepta que el INGAP pertenece a una familia de proteínas que aparecen en respuesta al daño y disminución de la masa de células β : las proteínas REG. Estudios previos han mostrado que la administración de un pentadecapéptido del INGAP (INGAP-PP) a ratones con diabetes inducida por estreptozotocina mejoró su glucemia y produjo un aumento aparente de la masa de sus células β , fenómeno que atribuyeron a un incremento en la neogénesis. Estudios más recientes de nuestro grupo demostraron que la administración de INGAP-PP durante 10 días a hámsters adultos normales induce un aumento significativo de la masa de células β como consecuencia de un aumento de la tasa de replicación y de neogénesis y una disminución de la de apoptosis de dichas células. En función de estos y otros resultados, se postuló que el INGAP participaría en la regulación de la masa de células β a través del incremento de la neogénesis insular. No se conoce sin embargo la secuencia cronológica real de aparición de las células INGAP positivas durante el período embrionario y en consecuencia su posible papel en la regulación de la masa de células del páncreas endocrino. El objetivo de la tesis fue estudiar la cronología de aparición de las células INGAP positivas en fetos de ratas normales y determinar la evolución de la masa de células INGAP positivas y de la masa de células insulares en ratas preñadas normales. Para lograr estos objetivos, utilizamos ratas Wistar hembra preñadas las cuales fueron divididas en cuatro grupos experimentales: animales con 11 (M11), 17 (M17) y 19 (M19) días de gestación y un grupo de animales a los cuales se los mantuvo junto a sus crías una semana luego de la parición (M28). Incorporamos además un grupo de ratas adultas controles no preñadas (M0). Estudiamos además los fetos de 17 días de gestación (E17), 19 días de gestación (E19) y las crías luego de una semana del nacimiento (P7). Medimos los pesos corporal y de los páncreas, las glucemias, la secreción de insulina *in vitro* frente a 3.3mM y 16.6 mM de glucosa y frente a 10mM de arginina en los fetos y crías y el contenido de insulina también *in*

vitro. En los adultos medimos además las insulinemias y calculamos los índices HOMA β e IR. En los fetos medimos los niveles de ARNm de Pdx-1 (factor de transcripción y diferenciación de células β) y Ngn3 (factor de transcripción tardío de células β y diferenciación endocrina), y dado que la secuencia del Ingap en la rata no ha sido identificada, se incorporó un par de cebadores para Reg3 β , que presenta un 71% de homología con la secuencia de Ingap de hámster; también se incorporó un par de cebadores a cuyo producto de amplificación llamamos degenerado (DegR-I) por haber sido diseñado en base a una región del ADNc de Reg3 β que posee alta homología con Ingap y que sería capaz de amplificar ambos ADNc debido a la incorporación de bases degeneradas. Finalmente, realizamos estudios de inmunohistoquímica en los páncreas de adultos, fetos y crías para estudiar la expresión de algunos marcadores de neogénesis (CK19, INGAP), replicación (PCNA) y de diferenciación de células β (PDX-1, NGN3, NKX6.1). Cuantificamos además la masa de células β y de células no- β , el porcentaje de células apoptóticas y el número de células que coexpresan PDX-1 e INGAP, posibles células madres del islote.

En los fetos las glucemias fueron significativamente menores en E17 y E19 respecto a los registrados en P7. Por otro lado, el peso corporal y de su páncreas se incrementó acorde con el avance de la edad. Los grupos E17 y E19 no respondieron frente al estímulo de glucosa 16.6mM y respondieron al estímulo de arginina. El grupo P7 respondió al estímulo de glucosa 16.6mM y arginina. Por otro lado, la secreción de insulina fue mayor frente a los tres estímulos con el avance de la edad. A partir del estudio morfométrico de los páncreas obtuvimos una masa β incrementada con el avance de la gestación y con valores máximos en P7, acompañado de un incremento en los marcadores PDX-1, INGAP y CK19, del número de células β extrainsulares y del tamaño de los islotes, y una disminución del porcentaje de células apoptóticas. Por otro lado, NGN-3 y PCNA disminuyeron en P7. No detectamos la presencia de la proteína INGAP en los fetos de 11 días. Los niveles de ARNm de los genes Pdx-1, Reg3 β y del producto de amplificación de los cebadores DegR-I mostraron un incremento en E19.

En el estudio en madres obtuvimos valores similares de glucemia en M11 respecto del control no preñado, con valores de insulinemia e índices HOMA β e IR mayores en M11, compatibles con un estado de IR acompañado de un mayor incremento del peso corporal. La secreción de insulina fue mayor frente a 16.6mM de glucosa respecto del basal en todos los grupos, siendo mayor en M28. A partir de la morfometría se vio un incremento en M19 en la masa β acompañado de un incremento en el número y tamaño de islotes, en el número de células β extrainsulares y en los marcadores PDX-1 y NKX6.1. En M17, precediendo al incremento de la masa β , se incrementó la

replicación y disminuyó la apoptosis, sin observarse diferencias en el marcador CK19 durante la preñez.

Por otra parte, a partir del estudio por RT-PCR obtuvimos fragmentos amplificados con los cebadores de Reg3 β y DegR-I utilizando molde de hámster y rata, mientras que obtuvimos producto de amplificación con los cebadores de Ingap solamente utilizando molde de hámster. La secuenciación del fragmento de PCR amplificado de 107 bases obtenido en este estudio con los cebadores degenerados DegR-I demostró 100 coincidencias (93.5%) con la región de Reg3 β tomada como base para diseñar los cebadores. Las 68 coincidencias (64%) de este fragmento con la secuencia de Ingap de hámster corresponden a bases que también coincidieron con la de Reg3 β . Por otra parte, la secuenciación del fragmento obtenido con los cebadores de Reg3 β en hámster y posterior comparación con la secuencia de Reg3 β de rata mostró un 97% de coincidencias.

En nuestro estudio en los fetos, la masa β total (fracción insular más extrainsular) aumentó progresiva y significativamente en el intervalo E17 y P7. Durante este estadio aparecieron las células INGAP-positivas y aumentaron su masa en función de la edad de gestación, logrando valores máximos en P7. Por lo tanto, el aumento progresivo en función de la edad, de la cantidad de insulina segregada y el reconocimiento de la concentración de glucosa coincidieron con el aumento de la masa de células INGAP-positivas. Otro hecho sugerente respecto a la relación INGAP- REG3 β es que el pico de expresión de su mensajero precedió (E19) al incremento de INGAP inmunodetectable (P7). Finalmente, dado que el anticuerpo utilizado para la detección inmunocitoquímica del INGAP reconoce un epítotope de 20 aminoácidos, cuya homología con el REG3 β es del 60%, puede sugerirse que la reacción inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-INGAP utilizado detectaría en la rata al REG3 β . Por otro lado y sumado a los resultados obtenidos por RT-PCR, podemos concluir que en el hámster coexistirían el REG3 β e INGAP, mientras que en la rata estaría solamente el REG3 β .

En la rata preñada, el aumento en la masa total de células β progresivo y significativo en función de la edad es un mecanismo compensador de la mayor demanda de insulina (IR) generada por las hormonas placentarias. El INGAP integraría el grupo de hormonas/reguladores que modifican la masa de células β , pero opuesto a lo ocurrido en el feto, su acción se manifestaría fundamentalmente afectando la replicación y sobre todo la apoptosis, con escasa o nula participación de la neogénesis. Al igual que en el feto, también incrementaría la capacidad secretora de las células β .

Más allá del aporte al conocimiento brindado por estos resultados, su aplicación permitiría contar con un nuevo enfoque terapéutico potencial de la diabetes.

ABSTRACT

2. ABSTRACT

Pregnancy is normally accompanied by progressive insulin resistance (IR) that starts in mid-gestation and progresses through the last third. As a result, there is an increase and/or hypertrophy of the β cell, and increased insulin secretion to compensate for this physiological IR.

Different hormones, genes, metabolic substrates and growth factors are involved in the control of the growth and development of the β -cell mass, including Islet Neogenesis Associated Protein (INGAP). INGAP was originally isolated from the hamster pancreas and subsequently cloned. Its presence in the rat pancreas has only been identified by immunocytochemical techniques. It is now accepted that INGAP belongs to a family of proteins – REG protein – that appear in response to β -cell mass damage and loss. Previous studies have shown that administration of an INGAP pentadecapeptide (INGAP-PP) to mice with streptozotocin-induced diabetes improved glycemia and produced an apparent increase of β -cell mass, a phenomenon attributed to an increase in neogenesis. More recent studies from our group demonstrated that INGAP-PP administration to normal adult hamsters during 10 days induced a significant increase in β -cell mass as a result of increased replication and neogenesis rates and decreased apoptosis in these cells. Based on these and other results, it was postulated that INGAP participates in the regulation of β -cell mass by increasing islet neogenesis. It is not known the real time of INGAP-positive cell onset during the embryonic period and its possible role on the regulation of pancreatic endocrine cell mass. The aim of this thesis work was therefore to study the chronology of appearance of INGAP-positive cells in fetal rats and to determine the normal evolution of the mass of INGAP-positive cells and insular cell mass in normal pregnant rats.

To achieve these objectives, we used pregnant female Wistar rats which were divided into four experimental groups: animals with 11 (M11), 17 (M17) and 19 (M19) days of gestation, and a group of animals which were kept together with their offspring one week after giving birth (M28). We also incorporated a control group of non-pregnant adult rats (M0), studied the fetuses of 17 (E17) and 19 (E19) days of gestation, and the offspring after a week of birth (P7). We measured body and pancreas weights, serum glucose, insulin secretion *in vitro* at 3.3mM and 16.6 mM glucose and 10 mM arginine in fetuses and offspring, and insulin content *in vitro*. In adults, we also measured insulinemia and calculated β and HOMA-IR indices. In fetuses we measured mRNA levels of Pdx-1 (β -cell differentiation factor) and Ngn3 (late transcription factor of β -cells) and given that the sequence of Ingap in the rat has not been identified, we incorporated a couple of Reg3 β primers that have a 71% homology with hamster Ingap and an amplification product (degenerate) by using a region of Ingap cDNA that has

high homology with that of Reg3 β and that would be able to amplify both cDNA due to the incorporation of degenerate bases. Finally, immunohistochemical studies were performed in the pancreas of adults, fetuses and offspring to study the expression of some neogenesis markers (CK19, INGAP), replication markers (PCNA) and transcription and differentiation factors of β -cell markers (PDX-1, NGN-3, NKX6.1). We further quantified the mass of β - and non- β cells, the percentage of apoptotic cells, and the number of cells coexpressing PDX-1 and INGAP, potential islet stem cells. .

In fetuses, serum glucose was significantly lower in E17 and E19 as compared to P7. On the other hand, body weight and the pancreas were increased in line with the progress of gestation. Groups E17 and E19 did not react to the stimulus of 16.6mM glucose, but did to arginine stimulation. The P7 group reacted to 16.6mM glucose and arginine. On the other hand, insulin secretion was higher at the three stimuli with advancing age. Morphometric results showed increased β -cell mass with the progress of pregnancy, peaks at P7 with an increase in PDX-1 markers, CK19, INGAP, number of extra islet β -cells and islet size, and a decrease in the percentage of apoptotic cells. Furthermore, Ngn3 and PCNA decreased in P7. We did not detect INGAP protein in 11-day fetuses. mRNA levels of Pdx-1 gene, Reg3 β and the amplified product using DegR-I primers increased in E19. The results obtained from M11 showed similar values of glycemia as compared to controls, and higher values of insulinemia and β and HOMA-IR indices, compatible with an IR state and accompanied by a greater increase in body weight. Insulin secretion was higher at 16.6mM vs. basal glucose in all groups and was higher in M28. Based on morphometric results, there was an increase in the β -cell mass of M19, accompanied by an increase in the number and size of islets, in the number of extra islet β -cells, in NKX6.1 and PDX-1. In M17, replication increased before the rise of β -cell mass and apoptosis was decreased, with no differences in CK19 during pregnancy.

Furthermore, from RT-PCR studies, amplified fragments were obtained with Reg3 β and DegR-I primers using hamster and rat mold, while an amplification product was obtained with Ingap primers using only hamster mold. The sequencing of the 107 bases fragment amplified by PCR in this study with the degenerate primers DegR-I showed 100 matches (93.5%) in the Reg3 β region taken as a basis to design primers. The 68 matches (64%) of this fragment with the hamster Ingap sequence corresponded to bases that also coincided with those of Reg3 β . Moreover, the sequencing of the fragment obtained with Reg3 β primers in hamsters and subsequent comparison with the rat Reg3 β sequence showed 97% of matches.

Results from our studies in fetuses showed that total β -cell mass (islet and extra islet) increased progressively and significantly in E17 to P7. During this stage, INGAP-

positive cells appear and the mass increases as a function of gestational age, reaching maximal values in the newborn. Thus, the progressive increase in terms of age, the amount of insulin secreted and the recognition of glucose concentration coincided with the rise of the mass of INGAP-positive cells. Another suggestive fact about the relationship INGAP-REG3 β is that the peak expression of its messenger was previous (E19) to the increase in immunodetectable INGAP (P7). Finally, since the antibody used for the immunocytochemical detection of INGAP recognizes an epitope of 20 amino acids whose homology with REG3 β is 60%, we could conclude that the immunocytochemical reaction with anti-INGAP antibody would detect REG3 β in the rat. On the other side, and added to the results obtained by RT-PCR, we can conclude that in the hamster INGAP and REG3 β coexist, while in the rat only REG3 β is detected. In pregnant rats, the progressive and significant increase in total β -cell mass according to gestational age is a compensatory mechanism for the increased demand of insulin (insulin resistance) caused by placental hormones. INGAP would integrate the group of hormones/regulators that modify β -cell mass, but opposite to that observed in the fetus, its action is primarily manifested affecting replication and above all apoptosis, with little or no involvement in neogenesis. As in the fetus, it also increased the secretory capacity of β cells. Beyond the contribution to knowledge provided by these results, their implementation would have a potentially new therapeutic approach for diabetes treatment.

INTRODUCCIÓN

3. INTRODUCCIÓN

3.1 EL PÁNCREAS: HISTOLOGÍA INSULAR

El páncreas es una glándula mixta compuesta por una porción exocrina, los acinos (98% de su masa) productores de enzimas digestivas, y una porción endocrina (2%) representada por los islotes de Langerhans, cuya función es vital para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa.

En los roedores, las células β se hallan en el centro de los islotes rodeadas de un manto de células no β (α , δ y PP) (Figura 1). Se han identificado cuatro tipos principales de células secretoras de hormonas: α , β , δ y PP.

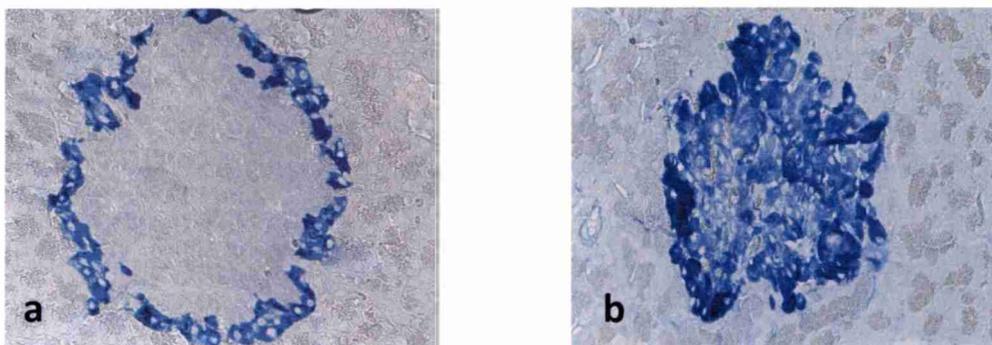


Figura 1: Fotografía de islotes pancreáticos células no β (a) y células β (b). 40 X.

Células β : son las más numerosas y cada islote contiene entre 1.000 y 2.000 células, ocupando preferentemente la parte central del mismo. Representan del 70 al 80% de la masa celular endocrina (1 a 2 g). Almacenan más de 13.000 gránulos secretorios que contienen insulina y otras proteínas y cuya membrana es capaz de fusionarse con la membrana plasmática en respuesta a un estímulo secretor apropiado. Los gránulos muestran inclusiones cristalinas características, consistentes en cristales formados por hexámeros de insulina-zinc rodeados por un amplio halo claro (Orci, 1985).

Células α : representan alrededor del 15% de la masa endocrina total y son las encargadas de producir y secretar glucagón, péptido de 29 aminoácidos. Al microscopio electrónico, estas células presentan gránulos de secreción con un centro de alta densidad electrónica y un estrecho halo periférico claro.

Células δ : representan del 5 al 10% de la masa endocrina y secretan somatostatina. Presentan una forma dendrítica con procesos citoplasmáticos que se unen al espacio pericapilar, siendo estas estructuras ricas en gránulos secretorios; esto sugiere un

mecanismo de secreción paracrino y una activa interacción con el resto de las células insulares. Al microscopio electrónico los gránulos secretorios se muestran redondeados, de densidad electrónica moderada, con membrana envolvente estrechamente adosada al contenido granular.

Células PP: ocupan el 10% de la masa endocrina y contienen polipéptido pancreático. Son especialmente abundantes en la parte posterior e inferior de la cabeza del páncreas, región derivada del brote pancreático ventral (Orci L, 1985). Sus numerosos gránulos de secreción son redondeados u ovalados con membrana envolvente adosada al gránulo propiamente dicho.

Además de las células mencionadas, los islotes poseen aproximadamente 1% de otros tipos celulares, fibroblastos y células endoteliales.

3.2 FISIOLÓGÍA DEL PÁNCREAS ENDÓCRINO

3.2.1 Biosíntesis de Insulina

La insulina, como toda proteína de exportación, se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso (RER) como un péptido precursor de cadena única denominado preproinsulina. En el RER, el péptido de señalización es escindido por una peptidasa y la molécula remanente (proinsulina) pasa al complejo de Golgi para continuar su procesamiento. La proinsulina es procesada por una endo y una exopeptidasa dando lugar a la formación de dos nuevos péptidos, la insulina y el péptido C. El péptido conector se acumula dentro de los gránulos en cantidades equimolares con la insulina (Ruiz M, 2004).

La insulina sintetizada en el RER permanece almacenada en los gránulos de secreción hasta su liberación en respuesta a algún estímulo. Las células β monitorean directa y constantemente la concentración de metabolitos circulantes, lo que les permite adecuar eficazmente la secreción de insulina a cada circunstancia. El prototipo de esos metabolitos circulantes es la glucosa, que estimula directamente tanto la secreción como la síntesis de insulina.

Para estimular la secreción de insulina, la glucosa debe metabolizarse en la célula β , para lo cual atraviesa la membrana a través del transportador GLUT2 y en el interior celular la glucosa es fosforilada a glucosa 6-P por acción de dos enzimas, la hexoquinasa y la glucoquinasa, cuya participación depende de la concentración de glucosa del medio. La primera actúa en presencia de bajas concentraciones de glucosa por debajo de los valores fisiológicos (K_m para la glucosa, aproximadamente

de 50 μM), mientras que la segunda tiene un K_m para la glucosa cercano a 10 mM (Matchinsky FM, 1990).

Cuando la glucemia aumenta y dado que el transporte de glucosa no es autolimitante, rápidamente se igualan las concentraciones de la hexosa fuera y dentro de la célula β . Al aumentar la concentración intracelular de glucosa, la hexoquinasa se satura y comienza a actuar la glucoquinasa, que regula el metabolismo ulterior de la glucosa y se transforma en su verdadero sensor. La metabolización de la glucosa promueve la formación de ATP a expensas del ADP y el consecuente aumento del cociente ATP/ADP. Este aumento produce el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}), aumentando así las cargas positivas en el interior celular, lo que induce la despolarización de su membrana y la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje; se produce entonces un aumento en la concentración de Ca^{2+} citosólico que promueve la exocitosis y la secreción de insulina (Ashcroft FM, 1988) (Figura 2).

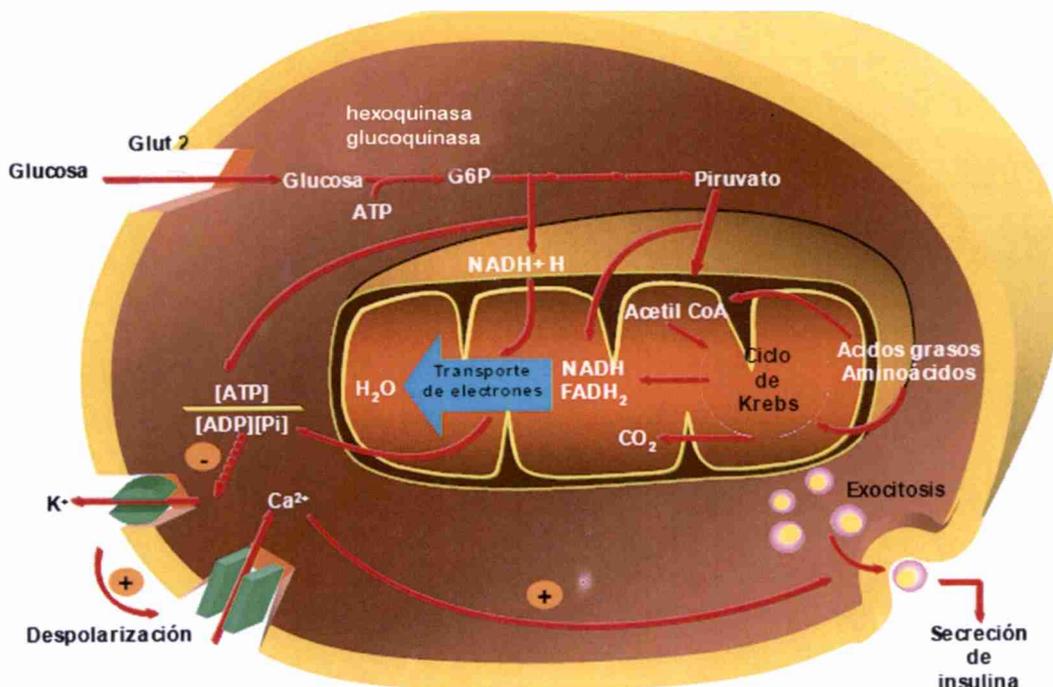


Figura 2: Proceso estímulo (glucosa) - secreción de insulina.

La liberación de insulina se produce en dos fases: una rápida de duración breve (primera fase) y otra más lenta y sostenida (segunda fase) (Figura 3).

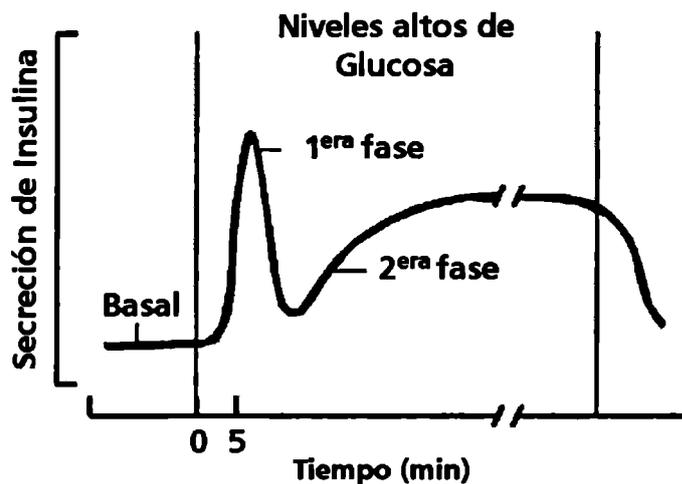


Figura 3: Secreción bifásica de insulina en respuesta al estímulo de glucosa.

El análisis matemático de esta modalidad secretoria en respuesta a la glucosa sugirió que la primera fase corresponde a la liberación de un compartimento relativamente pequeño y lábil de insulina depositada en gránulos ubicados en contacto con la membrana de las células β (O'Connor MD y col., 1980); se ha demostrado que la insulina liberada durante la primera fase produce un rápido ascenso de los niveles de insulina a nivel intersticial y una impregnación de los tejidos blanco, especialmente el hígado, que permite una regulación más efectiva del metabolismo de la glucosa (Getty L y col., 1998). Las evidencias demuestran que la misma cantidad de insulina administrada en forma bifásica aumenta su efecto hipoglucemiante, por lo que este proceso optimiza la actividad de la hormona (Albisser AM y col., 1974). Esta primera fase de la secreción de insulina se altera precozmente en la diabetes tipo 2.

Otra característica de la secreción normal de insulina es su liberación pulsátil, que promueve oscilaciones en la concentración periférica de insulina (Lang DA y col., 1979). Esta modalidad pulsátil es otro mecanismo de optimización de la función secretora: la cantidad de insulina requerida para lograr una determinada hipoglucemia es menor cuando se la administra en forma pulsátil que en forma continua (Matthews DR y col., 1983; Bratusch-Marrain PR y col., 1986); la desaparición de la modalidad pulsátil coincide con la manifestación de la tolerancia a la glucosa alterada.

3.2.2 Estímulos para la secreción de insulina

En el animal intacto, el incremento en la concentración plasmática de glucosa como así también de otros sustratos metabólicos (aminoácidos y algunos ácidos grasos),

estimula la secreción de insulina que promueve su transporte desde el medio extracelular al intracelular, con el consiguiente retorno de la glucemia a los niveles basales (Cingolani HE, 2000).

Los aminoácidos son también estímulo para la secreción de insulina, y el aumento de su concentración plasmática que acompaña a una comida rica en proteínas, estimula la secreción de la hormona.

La arginina, la lisina y la leucina son los aminoácidos con mayor potencia estimuladora. El mecanismo por el cual los aminoácidos estimulan la secreción de insulina no es común a todos ellos: mientras que algunos, como la arginina, no necesitan metabolizarse para ejercer su acción (Hermans MP y col., 1987), otros lo hacen aumentando la producción de ATP y despolarizando de esa manera la membrana plasmática.

Los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos también aumentan la secreción de insulina, pero sólo cuando alcanzan concentraciones elevadas (Malaisse WJ y col., 1990). Su mecanismo de acción implica un aumento del cociente ATP/ADP que desencadena la serie de eventos descrita anteriormente.

El potasio en altas concentraciones (20 mM) estimula la secreción de insulina mediante la alteración del potencial de membrana de las células β , con la consecuente apertura de los canales de Ca^{2+} .

3.2.3 Efecto de la insulina sobre los tejidos periféricos

La insulina aumenta el depósito de grasa en el tejido adiposo como consecuencia de la combinación de varios efectos:

- Aumenta la entrada de glucosa al adipocito a través de su efecto sobre el GLUT4.
- Aumenta la metabolización de la glucosa con el consecuente aumento de la formación de triosas y posterior producción de α -glicerofosfato, que mediante su esterificación con ácidos grasos favorece la síntesis de triglicéridos.
- Aumenta la síntesis de ácidos grasos de cadena larga a partir de la glucosa.
- Disminuye la lipólisis.
- Aumenta la captación de ácidos grasos de las lipoproteínas circulantes.

En el músculo, la insulina aumenta la captación de glucosa promoviendo su metabolización (glucólisis) y su depósito como glucógeno.

En el hígado, la insulina disminuye la liberación hepática de glucosa y promueve su almacenamiento como glucógeno. Inhibe la gluconeogénesis, la ureogénesis y la cetogénesis y estimula la síntesis de ácidos grasos y proteínas (Ruiz M, 2004).

3.2.4 Mecanismo de acción de la insulina

Su receptor es una molécula heterotetramérica compuesta por dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β transmembrana unidas por puentes disulfuro.

La unión de la insulina circulante al dominio extracelular de la subunidad α del receptor de las células efectoras induce un cambio conformacional en el receptor que permite la autofosforilación de los residuos tirosina de la subunidad β del dominio intracelular. Esta fosforilación estimula la actividad catalítica (tirosinoquinasa) de la subunidad β que pone en marcha la fosforilación de diversos sustratos proteicos endógenos tales como los sustratos del receptor de insulina (IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4) y las proteínas SHC (proteínas con homología SRC). El IRS-1 y el IRS-2 son los sustratos mejor caracterizados y más ampliamente distribuidos en el organismo, encontrándose principalmente en músculo esquelético, hígado y células β .

El IRS-3 se encuentra solamente en el tejido adiposo, mientras que el IRS-4 es característico del timo, cerebro y riñón (Withers DJ & White M, 2000; Burks DJ & White MF, 2001). Estas proteínas fosforiladas activan la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI-3K), que promueve, en el músculo y en el tejido adiposo, la translocación del transportador GLUT4 a la membrana celular, promoviendo así la entrada de la glucosa al interior celular y estimulando la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas.

Por otro lado, las proteínas SHC activan el complejo RAS que inicia una cascada de fosforilaciones que finaliza en las quinasas asociadas a los microtúbulos (MAP quinasas) (Figura 4).

Por lo tanto, la PI-3K media los efectos metabólicos de la insulina, mientras que el complejo RAS es responsable de sus efectos mitogénicos (Kido Y y col., 2001).

3.2.5 Insulinorresistencia y diabetes tipo 2

La insulinorresistencia (IR) se puede definir como la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer su efecto biológico en sus tejidos blanco, tales como el músculo esquelético, el hígado y el tejido adiposo. En estas condiciones, la respuesta de esos tejidos a la acción de la hormona disminuye y por lo tanto el páncreas debe incrementar la producción de insulina para mantener la homeostasis metabólica dentro de límites normales (Kahn SE y col., 1993).

Las personas con diabetes tipo 2 presentan dos defectos patológicos:

1. la disminución de la sensibilidad de los tejidos periféricos (tejido adiposo, muscular y hepático) a la acción de la insulina (IR) (Kahn CR y col., 1994) y

- una menor capacidad de las células β para aumentar la secreción de insulina para compensar la mayor demanda de la hormona consecutiva a la IR.

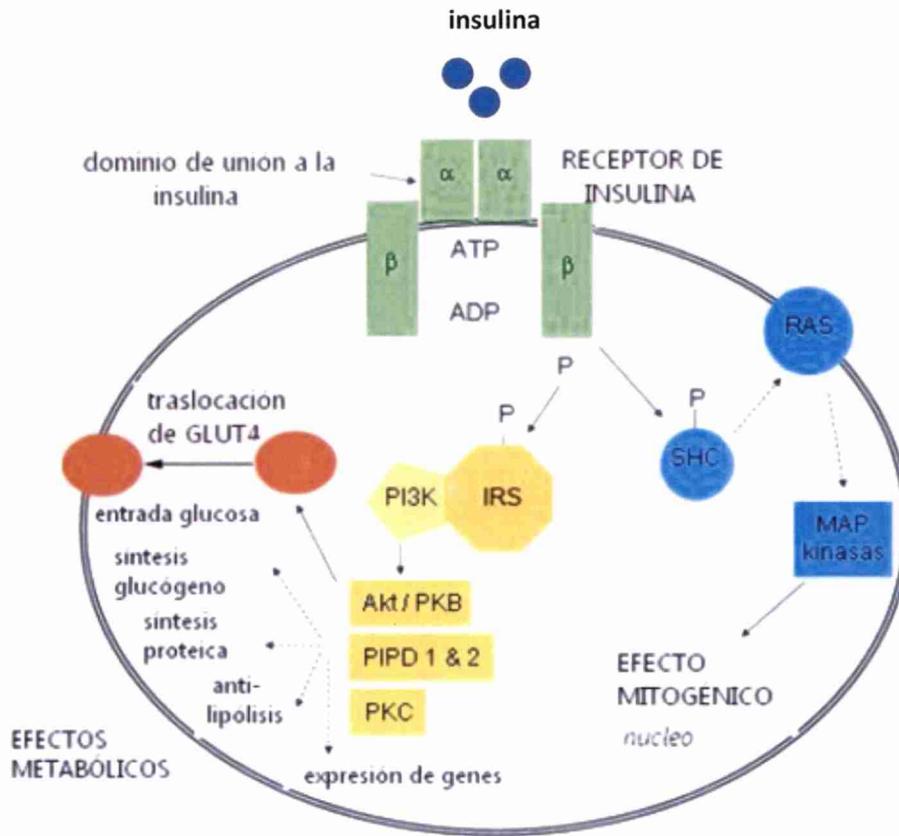


Figura 4: Esquema básico del mecanismo de acción de la insulina.

Se han propuesto cinco etapas para describir la progresión de la diabetes:

- La *primera etapa* se caracteriza por el mantenimiento de la función de las células β con conservación de la secreción de insulina en respuesta a la glucosa.
- La *segunda etapa*, en la que los niveles de glucosa comienzan a incrementarse llegando a 5-6.5 mmol/L; este es un estadio de adaptación de la célula β con disminución de su función y de su masa.
- La *tercera etapa* es un período transitorio e inestable con descompensación temprana en el cual los niveles de glucemia aumentan rápidamente hasta alcanzar valores diagnósticos de diabetes (126 mg/dL) en la *etapa cuatro*.
- La *etapa cinco* se caracteriza por una descompensación severa en la que hay una reducción marcada de la masa de células β , requiriéndose insulina exógena para controlar la glucemia (Gordon W & Bonner Weir S, 2004).

3.2.6 Insulinorresistencia fisiológica y diabetes gestacional

El embarazo se acompaña normalmente de una IR progresiva que comienza a mediados del período de gestación y progresa a través del tercer tercio. La IR sería la resultante de la combinación de un incremento en la adiposidad y de una insulino-desensibilización debida al efecto de hormonas placentarias. Las células β normalmente incrementan la secreción de insulina para compensar esta IR fisiológica (Xiang AH y col., 2004).

Cuando el aumento en la liberación de insulina es insuficiente para mantener la glucemia dentro de los niveles normales, aparece la hiperglucemia y se instala la diabetes gestacional.

La diabetes gestacional (DG) es una forma de hiperglucemia definida como intolerancia a la glucosa de grado variable que es detectada por primera vez durante el embarazo (American Diabetes Association, 2009).

3.2.7 Cambios metabólicos y morfológicos en la diabetes gestacional

Se ha demostrado claramente que la DG es una entidad clínica asociada con morbimortalidad fetal como macrosomía fetal, hipoglucemia neonatal, hipocalcemia, policitemia, hiperbilirrubinemia, síndrome de distrés respiratorio y mortalidad perinatal (American Diabetes Association 2009).

En modelos animales se ha visto que con glucemias entre 6.5 y 9.8 mmol/L, compatibles con una DG, los fetos presentan hiperplasia de los islotes e incremento de la concentración de insulina plasmática y pancreática (Bihoreau MT y col., 1986; Kervran A y col., 1978). Por otra parte fetos provenientes de madres con marcada hiperglucemia presentan un incremento en la masa insular (Aerts L y col., 1990).

3.3 EMBRIOLOGÍA DEL PÁNCREAS

El desarrollo normal del páncreas comienza a partir de un conjunto único de células progenitoras que se convertirán en células ductales, endocrinas o acinares.

Dentro del compartimento endocrino, las células se diferencian en células α , β , δ y PP. Este proceso está regulado por la expresión diferencial de genes que están controlados por una red de factores de transcripción.

En respuesta a señales provenientes de tejido mesodérmico, la morfogénesis pancreática en el ratón comienza en el día 9,5 con evaginaciones del endodermo intestinal para formar el primordio ventral y dorsal; éstos se fusionan en el día 16,5 (Reusens B y col., 2000).

La expresión inicial de Pdx-1 (E8,5-E9,0) marca el endodermo pre-pancreático (Ahlgren U y col., 1996; Guz Y y col., 1995; Offield MF y col., 1996) y corresponde al

período clásicamente definido como especificación pancreática o transición primaria (Wessells NK & Cohen JH, 1967). La expresión temprana de Pdx-1 es utilizada como marcador de identificación pancreática aunque abarca en los próximos días el estómago, duodeno y conducto biliar. Su expresión se debe al silenciamiento de gen Sonic hedgehog (shh) por estímulos provenientes de la notocorda en el brote dorsal, de las venas vitelinas y del mesodermo cardiogénico para la diferenciación del brote ventral.

Otro factor de transcripción – el ptf1a – también se expresa en el páncreas temprano y sigue siendo páncreas-específico a lo largo del desarrollo (Kawaguchi Y y col., 2002).

Las células PDX-1 representan células progenitoras de todos los tipos celulares maduros del páncreas: células acinares, ductales y endócrinas (Gu G y col., 2002). El Ptf1a se ha identificado como un gen activador acinar (Krapp A y col., 1996).

El PDX-1 se ha identificado también como regulador del gen de la insulina 1 en la rata (Ohlsson H y col., 1993) y a partir del día E15,5 su expresión está restringida a las células β .

La transición de las expresiones de Pdx-1 y Ptf1a coincide con la conversión de células progenitoras maduras tanto endocrinas como exocrinas (Figura 5). La vía clásica para especificar el destino particular de cada célula está mediado por el Notch-Delta serrate. En el páncreas, el bloqueo de la activación del receptor Notch resulta en una alta expresión del gen de neurogenina 3 y promueve el desarrollo endocrino.

En contraposición, las células con la señalización Notch activa adoptan destino acinar o permanecen como células progenitoras indiferenciadas (Edlund H, 2001) (Figura 6). El destino final de las células endocrinas está determinado por la expresión de una serie de factores de transcripción específicos para cada tipo celular. Muchos de ellos son marcadores tempranos como el Pax4, Nkx2.2 y Nkx6.1 coexpresados con Ngn-3; otros son marcadores tardíos como el Pax6, Isl-1, Hb9 y Pdx-1 para las células β .

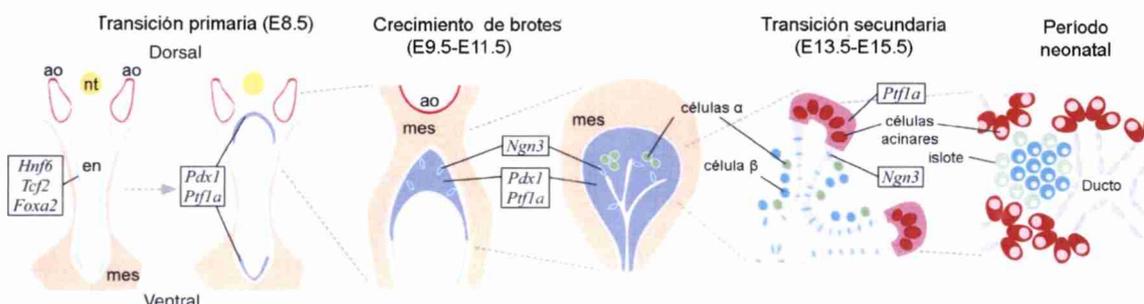


Figura 5: Esquema de las etapas del desarrollo pancreático;
mes: mesénquima; *en*: endotelio; *ao*: aorta; *nt*: notocorda

En el páncreas temprano, el número de células NGN-3 positivas es pequeño, se incrementa notablemente hacia la mitad de la embriogénesis y finalmente declina al nacimiento (Gradwohl G y col., 2000; Schwitzgebel VM., 2000).

El gen de Ngn3 se expresa en células epiteliales símil-ductos; cuando estas células se diferencian disminuye la expresión de NGN-3, dejan el epitelio y se agrupan en estructuras protoinsulares. (Pictet R & Rutter WJ, 1972; Schwitzgebel VM y col., 2000).

La diferenciación de células β ocurre simultáneamente con la de células acinares, aunque en diferentes regiones del órgano, durante un período denominado transición secundaria (Pictet R & Rutter WJ, 1972). Las nuevas células insulares diferenciadas no se dividen y recuperan su nivel de proliferación al nacimiento (Sander M y col., 2000).

Simultáneamente, la vascularización comienza a invadir estos nidos de células endocrinas inmaduras que co-expresan hormonas pancreáticas y neuropéptidos y que formarán los islotes de Langerhans (Reusens B y col., 2000).

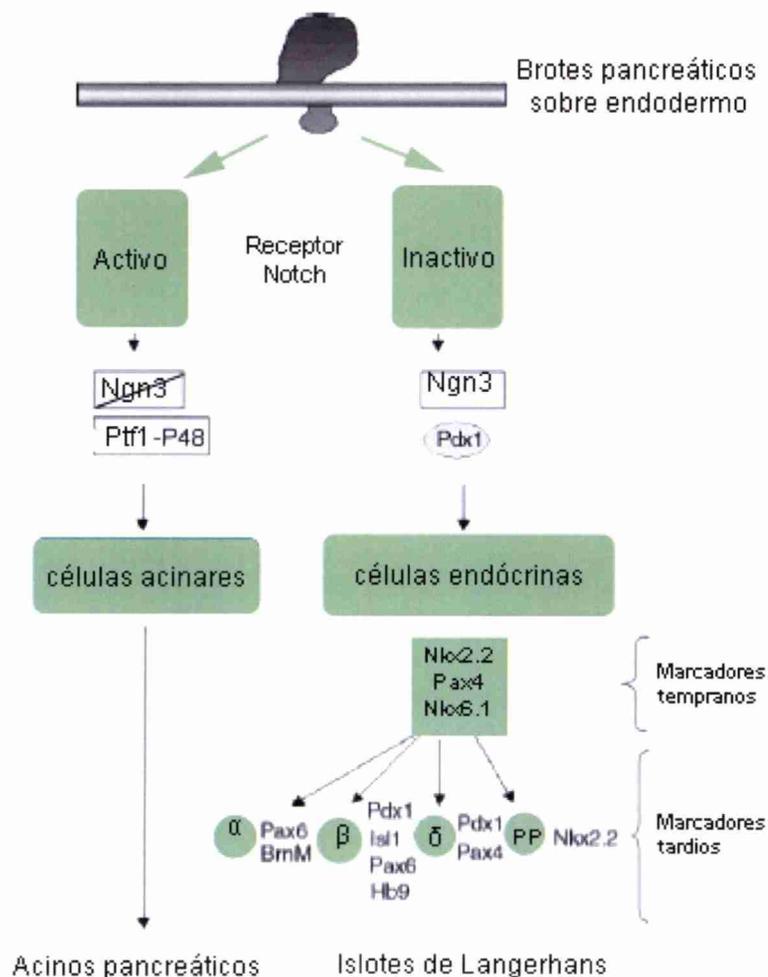


Figura 6: Esquema de acción de Notch-Delta serrate

Factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento vascular (VEGF) y el factor de crecimiento fibroblástico 7 (FGF-7) se expresan dentro del estroma pancreático adyacente al epitelio ductal y contribuyen a la formación de las células endocrinas y a la expansión del islote (Kaung HL, 1994).

El PDX-1 parece tener un doble papel:

- a) como inductor de células del linaje endócrino a partir de células ductales epiteliales y en la maduración de células β , y
- b) en el control de la expresión del gen de insulina.

3.3.1 Crecimiento del páncreas en el período fetal, neonatal y adulto

En la etapa final de la gestación hay una expansión diaria rápida de células β que comienza en la rata el día 16 post-concepción, por lo que casi se duplica la población de células β (Mc Evoy RC & Madson KL, 1980).

En fetos de rata, el crecimiento de la masa de células β se debe en parte a la actividad mitótica (replicación de células β maduras preexistentes), restringida a un número limitado de células β ($\leq 10\%$) (Swenne I & Eriksson U, 1982), mientras que el 80 a 90% del incremento se lo atribuye a la neogénesis a partir de células precursoras indiferenciadas (Bowens L & De Blay E, 1996).

La vida fetal representa la ventana crítica en la cual se determina el número apropiado de células β . La malnutrición del feto resultante de una restricción de la alimentación materna genera una masa reducida de células β en las crías (Garofano A y col., 1997). En este modelo se observó que en el período fetal, la actividad mitótica de estas células no está afectada, pero sí en cambio la neogénesis, alteración que sería responsable de la disminución de la masa celular β . Más aún, una malnutrición durante el período perinatal conduce años más tarde al desarrollo de diabetes tipo 2, debido aparentemente a la incapacidad de la masa de células β para adaptarse ante una demanda adicional de insulina durante el envejecimiento (Garofano A y col., 1999).

En roedores neonatos el crecimiento de la masa celular β es aún posible, pero su tasa es muy reducida comparada con el crecimiento fetal (Kaung HL, 1994; Mc Evoy RC & Madson KL, 1980 y 1981; Wang RN y col., 1994). Se ha descrito la existencia de replicación y neogénesis de células β a partir de células ductales, cercanas a los islotes neonatales y que exhiben un índice de replicación más elevado que las células insulares diferenciadas (Bowens L y col., 1994). Por otra parte, la apoptosis, un tipo de muerte celular, está incrementada durante el período de lactancia y está asociada a un descenso transitorio de la tasa de crecimiento de los islotes en roedores (Scaglia L

y col., 1997); paralelamente, en este período ocurren cambios importantes en la maduración de las células β .

Entre el primero y séptimo mes de vida, el crecimiento de la población de células β se incrementa entre cinco y siete veces en ratas hembra y macho, respectivamente (Mc Evoy RC, 1981). La población de células β aumenta a una tasa diaria de 2 y 3% en ratas macho, mientras que el crecimiento es significativamente menor en las ratas hembra (Wang RN y col., 1996). Después de los siete meses de edad, el crecimiento de la población de células β disminuye considerablemente, pero aún continúa hasta aproximadamente los 20 meses, período correspondiente a la edad adulta en la rata (Montanya E y col., 2000). El número de células β /kg de peso corporal desciende significativamente en ratas con el envejecimiento (Wang RN y col., 1996).

3.3.2 Hormonas placentarias y compensación de la masa β

La masa de células β puede compensar la demanda creciente de insulina durante el embarazo/preñez.

Al final de la preñez, la masa de células β se incrementa 2,5 veces respecto de hembras no preñadas (Blondeau B y col., 1999; Van Assche FA y col., 1980), como resultado del incremento tanto en el número como en el tamaño de las células (hipertrofia) (Van Assche FA y col., 1978). En las ratas, luego de la preñez ocurre un rápido descenso de la masa de células β (Marynissen G y col., 1983) debido a un descenso en la tasa de replicación y en el tamaño de las células β y un incremento en la tasa de apoptosis (Scaglia L y col., 1995).

Durante la preñez las hormonas placentarias, especialmente el lactógeno placentario (LP), es el responsable de los cambios en la masa de células β .

En la rata, durante los primeros 10-12 días de preñez hay picos de secreción nocturnos y diurnos de LP que, a través del aumento de la actividad de neuronas hipotalámicas dopaminérgicas, suprimen la secreción de prolactina (PRL) durante la segunda mitad de la preñez. Inmediatamente antes de la parición, un incremento de la relación estrógeno/progesterona provoca un gran aumento de PRL (Andrews ZB, 2005).

En la rata, la elevación crónica de la PRL está asociada con un incremento en el consumo de alimento y del peso corporal (Baptista T y col., 2004; Byatt JC y col., 1993; Gerardo-Gettens T y col., 1989).

Durante la preñez, la prolactina y el LP producen un incremento significativo de:

1. la secreción de insulina en respuesta a la glucosa debido a un descenso del umbral de sensibilidad a la glucosa,
2. la síntesis de insulina,

3. la proliferación e hipertrofia de las células β ,
4. el número de uniones gap intercelulares,
5. el metabolismo de la glucosa (Sorenson RL & Brelje TC 2001; Brelje TC y col., 1993; Shao J y col., 2004).

La infusión de PRL en ratas disminuye el umbral de estimulación de glucosa, incrementa la secreción de insulina e incrementa el acoplamiento de células β . La PRL y el LP estimulan la secreción de insulina en islotes aislados. Como mencionáramos anteriormente, durante la preñez se disminuye el umbral de las células β para la glucosa. Dos componentes de la célula β están involucrados en dicha acción: el GLUT2 y la glucoquinasa (ver descripción previa de la regulación de la secreción de insulina) y ambos son estimulados por la PRL en islotes aislados, en células INS-1 y en células MIN6 (Shao J y col., 2004; Weinhaus AJ y col., 1996; Matsuda M y col., 1996).

La PRL regula la masa y función insular mediante la fosforilación de IRS1/2 y la activación de la PI3K y de la vía MAPK (Amaral ME y col., 2004; Saad MJ & Boschero AC, 2003). Análisis de microarray de islotes de rata tratados con PRL mostraron un incremento en la expresión de genes asociados con la regulación del ciclo celular y simultáneamente una disminución de genes asociados con la apoptosis (Bordin S y col., 2004).

Datos de estudios clínicos sugieren que la PRL ejerce efectos diabetogénicos dado que la hiperprolactinemia se asocia frecuentemente con hiperinsulinemia e IR (Serri O y col., 2006; Yavuz D y col., 2003).

En la rata, la expresión del receptor de PRL (PRL-R) ha sido detectada en islotes pancreáticos de embriones de 17,5 días e inmunorreactividad al receptor detectada dos días después (Royster M y col., 1995; Freemark M y col., 1997). En el período de gestación temprano el receptor se expresa principalmente en células acinares y ductales, pero a su término y en el período postnatal, co-localiza con la insulina y el glucagón. La reducción observada en el tamaño celular β , la masa celular β , el contenido de insulina y la secreción de insulina en respuesta a la glucosa en ratones deficientes en PRL/LP confirman su importancia en el control del desarrollo insular (Freemark M y col., 2002).

3.3.3 Regulación de la masa de células β por factores de crecimiento

Diferentes hormonas, genes, sustratos metabólicos y factores de crecimiento están involucrados en el control del crecimiento y desarrollo de la masa de células β (Nielsen JH & Serup P, 1998). Las células β pueden formarse como resultado de la división mitótica de células β preexistentes (replicación) o diferenciación a partir de células

progenitoras (neogénesis) (Bonner Weir S, 1994; Bowens & Klöppel, 1996; Leahy JL, 1996).

Entre las hormonas, la insulina, al igual que otras hormonas, participa en la regulación de la masa de células β (Otani K y col., 2004). Recientemente se ha demostrado que el glucagón insulino-símil 1 (GLP-1) aumenta la función, replicación, y neogénesis de las células β y disminuye la apoptosis. La administración de un análogo del GLP-1 a ratones obesos (ob/ob) hiperglucémicos mejora la glucemia e incrementa la masa y replicación de sus células β (Rolin B y col., 2002). Además, el GLP-1 retrasa el desarrollo de la diabetes en ratones db/db (Wang Q & Brubaker PL, 2002) y en ratones diabéticos disminuye la glucemia e incrementa la masa de células β , a través del aumento de células precursoras ductales que expresan PDX-1 (neogénesis) (Stoffers DA y col., 2000). Además de poseer un efecto estimulador en las células β diferenciadas sobre su replicación e inhibidor de su apoptosis, el GLP-1 sería un factor de diferenciación importante que modularía la neogénesis (Li Y y col., 2003).

Respecto a los genes, ratones transgénicos doble heterocigotos nulos para el gen del receptor de insulina y el sustrato del receptor de la insulina (ratones IR/IRS) presentan una IR severa acompañada de hiperplasia compensatoria de células β , con incremento significativo de su masa (Bruning JC y col., 1997).

Por otra parte, la glucosa afecta la dinámica poblacional de las células β . Islotes fetales cultivados con diferentes concentraciones de glucosa mostraron un incremento en la proporción de células β en función del aumento de la concentración de la hexosa en el medio de cultivo (Swenne I & Eriksson U, 1982). Evidencias obtenidas empleando una amplia variedad de procedimientos tales como diferentes especies animales (Shafir E y col., 1999) pancreatometomía subtotal (Cardezza AF & Rodriguez RR, 1949; Lee HC y col., 1989) e infusión de glucosa hipertónica (Bonner Weir S y col., 1989) muestran claramente que cambios en la concentración de glucosa extracelular modulan rápidamente la secreción de insulina y el crecimiento de células β *in vitro* e *in vivo* (Bonner Weir S y col., 1989, Bonner-Weir S, 1994a; Swenne I & Eriksson U, 1982). Más aún, en animales con niveles de glucosa normal, otras intervenciones como manipulación alimentaria (Lombardo YB y col., 1983; Luo 1998), la preñez (Parsons JA y col., 1992), la ligadura del conducto pancreático (Wang RN y col., 1995), la envoltura de la cabeza del páncreas en celofán (Rosenberg L y col., 1983) o la administración de sulfonilureas (Loubatieres A, 1964) causan cambios similares en ambos parámetros.

Respecto a las manipulaciones alimentarias, se ha demostrado que la administración de una dieta rica en sacarosa (DRS) induce aumento de los niveles séricos de triglicéridos y colesterol, hiperinsulinemia, IR y tolerancia a la glucosa alterada,

características similares a las observadas en el síndrome metabólico humano (Cohen AM y col., 1977; Cohen AM, 1978).

Nuestro grupo demostró que la administración de una DRS a ratas normales durante seis meses induce las mencionadas alteraciones metabólicas, junto con un aumento significativo tanto del número de islotes pancreáticos como del área de células β (Lombardo YB y col., 1996). Estos cambios se acompañaron de valores normales de insulinemia y del contenido de insulina pancreática.

Por otra parte, demostramos que la administración de sacarosa a hamsters jóvenes normales produjo cambios pancreáticos dependientes del tiempo de tratamiento, con aumento de la masa de células β debido al incremento en su tasa de replicación y de la neogénesis insular, coexistiendo con valores normales de glucemia (Del Zotto H y col., 1998).

La administración de una dieta similar a hamsters normales preñadas indujo en los animales recién nacidos (1 semana de edad) cambios pancreáticos similares pero de mayor magnitud, acompañados por una disminución significativa tanto de la tasa de apoptosis de células β como de las glucemias (Gagliardino JJ y col., 2000).

Varios factores de crecimiento ejercen un efecto estimulador sobre la replicación de la células β *in vivo* o *in vitro*. Esto incluye al factor de crecimiento insulina similar-1 y 2 (IGF-1, IGF-2), al factor de crecimiento plaquetario (PDGF), al factor de crecimiento epidérmico (EGF) y otros como la Proteína Asociada al Crecimiento y Neogénesis Insular (INGAP).

3.3.4 INGAP: Proteína Asociada a la Neogénesis Insular

El INGAP forma parte del complejo proteico llamado ilotropina, aislado del extracto de páncreas de hamsters normales a los cuales se les obstruyó parcialmente el conducto pancreático envolviendo la cabeza de su páncreas con celofán (Pittenger GL y col., 1992). Este procedimiento induce la formación de nuevos islotes a partir de ductos dentro de las dos semanas con recapitulación de la ontogenia fetal normal (Bonner-Weir S & Smith FE, 1994; Rosenberg L, 1995). Entre 10 a 14 días después de realizada la envoltura de la cabeza del páncreas, las células comienzan a migrar desde el epitelio ductal y se organizan en pequeñas estructuras similares a islotes. Luego de seis semanas, el análisis morfológico del páncreas mostró un incremento de 2,5 veces de la masa celular insular comparada con los controles (Rosenberg L, 1983).

El complejo proteico denominado ilotropina se ha caracterizado sólo parcialmente. Se sabe que tiene un peso molecular aparente en el rango de 29-44 kD, es soluble en ácido y termoestable, precipitable con etanol y sensible a la digestión con tripsina

(Vinik AI y col., 1996). Rafaeloff y colaboradores (1997) demostraron que el principio activo de la ilotropina es el INGAP. El ARNm del INGAP se encontró sólo en células acinares de los animales a los cuales se les había envuelto la cabeza de su páncreas, hecho que permitió su asociación con la neogénesis insular observada en estos animales. Posteriormente, nuestro grupo demostró su localización en células insulares no- β y en células ductales (Flores LE y col., 2003).

Por otra parte, Rafaeloff y col. sintetizaron un pentadecapéptido cuya secuencia corresponde a la de los aminoácidos 104-118 del INGAP para estudiar si era capaz de reproducir el efecto biológico de la proteína completa. Seleccionaron este fragmento ya que es la región que difiere de otros péptidos capaces de inducir regeneración insular, tales como los pertenecientes a la familia REG (Okamoto H, 1999). Este pentadecapéptido sintético estimuló la incorporación de ^3H -timidina en células epiteliales ductales y de la línea celular epitelial ARIP, pero no ejerció dicho efecto en las células insulares.

Empleando modelos de simulación, nuestro grupo estudió las propiedades dinámicas del pentadecapéptido del INGAP (INGAP-PP) y la de otros dos pentadecapéptidos conformados por los mismos aminoácidos pero con diferente secuencia (scrambled); los resultados obtenidos demostraron que mientras que el INGAP-PP mantiene una notable estabilidad de su plegamiento terciario con una conformación de hoja β central y un C-terminal cerrado, los otros dos péptidos no evidenciaron en solución una estructura definitiva prevalente (Figura 7) (McCarthy AN y col., 2009). Estos datos:

- a) sugieren que la región C-terminal podría ser la que interactúa con su receptor celular y
- b) explican razonablemente por qué los péptidos con la secuencia alterada no incrementan la respuesta secretora de las células β insulares como sí lo hace el INGAP-PP tanto *in vitro* como *in vivo*, ni incrementan la masa de células β *in vivo*.

La estructura mencionada es semejante a la de la secuencia de la proteína asociada a la pancreatitis humana (PAP-1) con un 85% de homología. Graf R y col. (2005) describieron sinónimos de terminología utilizadas para las proteínas REG y PAP a partir de la comparación y alineamiento de sus secuencias. Estos autores describen a la familia REG 3 (1, 2 y 3) como sinónimo de PAP (I, II, y III), en rata.

El INGAP tiene una alta homología con la familia de proteínas REG, con un 72% de homología con Reg3 δ en ratón (Abe M y col., 2000). Recientemente, Gurr W y col. (2007) desarrollaron anticuerpos REG específicos que confirmaron la ausencia de REG3 δ en islotes normales e identificaron REG3 α en el islote de ratón maduro. Otros REG han sido descritos en islotes; sin embargo, su expresión está restringida a las células β (Terazono K y col., 1990). Miembros de la familia REG han sido detectados

durante la embriogénesis del ratón: el mensajero de REG1 fue identificado en el día 9 de embriogénesis y el de REG2 en el día 12 (Perfetti R y col., 1996). REG3 δ y REG3 α se expresan en el páncreas en el día 10. Células inmunoreactivas a INGAP/REG3 han sido detectadas en embriones de ratón de 14,5 días (Hamblet NS y col., 2008).

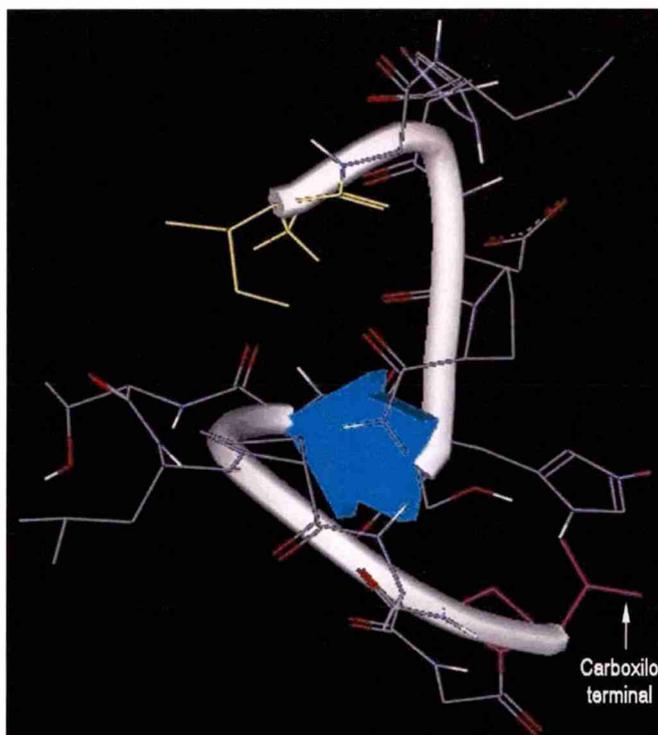


Figura 7: Estructura tridimensional de la molécula de INGAP.
La flecha celeste señala el plegamiento lámina beta.

El INGAP es sintetizado en el páncreas y una vez secretado circula unido a proteínas séricas hacia otros tejidos, donde interactúa con receptores específicos (Borelli MI y col., 2007).

Nuestro grupo ha mostrado un incremento de la secreción de insulina en islotes de rata cultivados en presencia del pentadecapéptido (INGAP-PP) (Borelli MI y col., 2005). Este efecto del INGAP-PP se ejercería a través de la vía colinérgica, tal como lo describieron Barbosa H y col. (2006) en islotes cultivados de neonatos de rata, donde observaron un incremento en los ARNm de AKT1, FRAP1 y MAPK1 como así también de los receptores muscarínicos M3.

Complementariamente, el INGAP-PP actuaría a nivel de los canales de K⁺ dependientes de ATP (K_{ATP}), como lo demostraron Silva KE y col. (2008). No puede descartarse, sin embargo, un efecto directo del INGAP-PP a nivel del metabolismo insular de glucosa.

Por otra parte, la administración simultánea de INGAP-PP y estreptozotocina disminuyó el porcentaje de ratones diabéticos (Rosenberg L y col., 2004). Estos

autores demostraron que la administración de INGAP-PP a ratones con diabetes inducida por estreptozotocina mejoró su glucemia y produjo un aumento aparente de la masa de sus células β , fenómeno que atribuyeron a un incremento aparente en la neogénesis.

Nuestro grupo demostró que la administración de una DRS a hamsters normales durante tres semanas induce un incremento en la masa de células β y en la de células INGAP-positivas; el aumento en la masa de células β se acompañó de un incremento significativo en la tasa de neogénesis. En función de estos resultados, se postuló que el INGAP participaría en la regulación de la masa de células β a través del incremento de la neogénesis insular (Del Zotto H y col., 2000).

Estudios más recientes de nuestro grupo demostraron que la administración de INGAP-PP durante 10 días a hamsters adultos normales, induce un aumento significativo de la masa de células β como consecuencia de un aumento de la tasa de replicación y de neogénesis y una disminución de la de apoptosis de dichas células (Madrid V y col., 2009).

Por otra parte se ha propuesto que la iniciación de la neogénesis insular en el adulto reproduce en parte la cascada de desarrollo del páncreas endócrino. Estudios previos han mostrado que el promotor del INGAP tiene sitios de unión para factores de transcripción importantes como el PDX-1 que se une directamente al promotor del Ingap (Taylor- Fishwick DA y col., 2003; Taylor- Fishwick DA y col., 2006). La identificación de estos sitios de unión específicos para factores de transcripción endocrinos sugiere que el INGAP podría expresarse y participar en la regulación de la masa de células endocrinas durante la ontogenia del páncreas. No se conoce, sin embargo, la secuencia cronológica real de aparición de las células INGAP-positivas durante el período embrionario y en consecuencia, su posible papel en la regulación de la masa de células del páncreas endócrino.

3.4 OBJETIVOS

- 1. Estudiar la cronología de aparición de las células INGAP-positivas en fetos de ratas normales.**
- 2. Determinar la evolución de la masa de células INGAP-positivas y de la masa de células insulares en ratas preñadas normales.**

MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales

Se utilizaron ratas hembra preñadas pertenecientes a la cepa WKAH/Hok *Rattus norvegicus*, cuyos progenitores proceden de Hokkaido University (Japón). Los animales fueron criados y reproducidos en sistema cerrado del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Al día 3 de preñez los animales fueron retirados y mantenidos en nuestro bioterio, en la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata.

4.1.1 Mantenimiento de los animales

Los animales se mantuvieron en un ambiente con temperatura/humedad (23 ± 1 °C, 50% de humedad) y ciclos de luz/oscuridad controlados de 12 hs. cada uno.

4.1.2 Grupos experimentales

Treinta ratas de la especie *Rattus norvegicus* de la variedad Wistar de 160-190 gramos de peso corporal se dividieron en cinco grupos experimentales: animales adultos controles no preñadas M0, animales con 11 (M11), 17 (M17) y 19 (M19) días de gestación y un grupo de animales a los cuales se los mantuvo junto a sus crías una semana luego de la parición (M28).

Los animales tuvieron libre acceso al agua y a una dieta comercial estándar. En todos los grupos se registró la cantidad de agua y comida sólida ingeridos diariamente y el peso corporal individual inicial y final.

Las edades fueron elegidas en base a las transiciones primaria y secundaria descritas durante el desarrollo del páncreas (Pictet R & Rutter WJ, 1972; Jensen J y col., 2000). En la rata la transición primaria (aparición de brotes dorsal y ventral) comienza en el día 11, mientras que la transición secundaria (diferenciación de células endocrinas) se da entre los días 15 y 17,5 del desarrollo embrionario.

Denominamos a los fetos de 11, 17 y 19 días de gestación como E11, E17 y E19, respectivamente, mientras que llamamos P7 a las crías de los adultos mantenidos durante una semana postparto. Dado que en E11 solamente se observaron brotes pancreáticos, los estudios dependientes de páncreas no fueron posibles y se limitaron a la realización de inmunohistoquímica para visualizar la aparición del INGAP y otros marcadores pancreáticos que permitieron la identificación de los primordios pancreáticos.

Se consideró día cero de gestación al día en el cual se observó el tapón vaginal.

4.1.3 Sacrificio y obtención de muestras

Madres: Cumplido el período de gestación, los animales fueron anestesiados para facilitar su manipulación utilizando anestesia inhalatoria ligera con isoflurano (Forane®, Abbot). En ese momento se registró el peso del animal y se extrajo sangre por punción del plexo retroorbitario con un capilar heparinizado. Luego se sacrificaron por dislocación cervical y posteriormente se removió y pesó el páncreas entero.

Fetos: Se realizó la disección del útero materno con sus respectivos fetos, los cuales fueron pesados y posteriormente se extrajeron los páncreas bajo microscopio estereoscópico Carl Zeiss. En los fetos de once días se extrajo el embrión entero.

Crías: las crías fueron sacrificadas por decapitación para luego extraerles los páncreas bajo microscopio estereoscópico Carl Zeiss.

Para el estudio morfológico de los páncreas se tomó una porción de la cola del páncreas adulto y la totalidad del páncreas de los fetos y las crías de una semana postparto; el material se fijó con formol al 4% en buffer pH 7,1

El páncreas remanente se colocó inmediatamente en buffer Krebs-Ringer-Bicarbonato (KRB), cuya composición es la siguiente: NaCl 118 mM; NaHCO₃ 25,96 mM; KCl 4,74 mM; CaCl₂ 2,24 mM; MgSO₄ 1,19 mM; KH₂PO₄ 0,91 mM. El buffer se gaseó y equilibró con una mezcla de O₂/CO₂ (95/5%) a pH final 7,4; este tejido se utilizó para estudiar secreción y contenido de insulina.

4.2 Determinación de insulinemias y glucemias

La concentración de insulina en suero de los animales adultos se determinó por radioinmunoanálisis (RIA) (Herbert V y col., 1965), utilizando un anticuerpo anti-insulina y un estándar de insulina de rata (Kit de Linco Research Inc., IN, USA).

Las glucemias se determinaron utilizando tiras reactivas One Touch de Johnson & Johnson; en los adultos se determinaron al momento de la extracción de sangre, en las crías de una semana de edad al momento de la decapitación, y en los fetos se midieron las glucemias en sangre del cordón umbilical.

4.2.1 Cálculo de los índices HOMA insulinorresistencia y función β

A partir de los resultados obtenidos de glucemias e insulinemias se calculó el índice de IR (HOMA-IR) utilizando la siguiente fórmula: insulinemia (μ U/ml) x glucemia (mmol/L)/22,5.

La función β (HOMA- β) se obtuvo a partir de la fórmula: insulinemia (μ U/ml) x 20 /glucemia (mmol/L) - 3,5 (Matthews DR y col., 1985). También se calculó la relación molar insulina/glucosa en ambos grupos experimentales

4.3 Secreción de insulina

Para verificar la secreción de insulina utilizamos trozos pequeños de los páncreas de cada uno de los animales adultos, mientras que para los fetos y crías de cada edad gestacional se combinaron páncreas provenientes de crías de una misma madre. Los trozos de páncreas se colocaron en tubos conteniendo una membrana de papel de filtro en uno de los extremos, el que se sumergió en el medio con la solución estímulo correspondiente; se incubaron a 37° C en buffer KRB con albúmina bovina (BSA) más el agregado de 1% del inhibidor de tripsina (Trasyolol) y dos concentraciones diferentes de glucosa (3.3 y 16.7 mM) (Gagliardino JJ y col., 1974) durante 1 h. Los páncreas fetales fueron incubados además en presencia de arginina 10mM (sin glucosa).

Los tubos se pesaron antes (vacíos) y después de la incubación (cargados con trozos de páncreas) para posteriormente colocarlos en estufa a 37° C para determinar así el peso seco del páncreas; expresamos la secreción de insulina por miligramo de tejido.

Al final de la incubación se recuperó el medio y se lo guardó a -20° C para determinar la concentración de insulina por RIA (Herbert V y col., 1965).

4.4 Contenido de insulina

Para determinar el contenido de insulina pancreática de los animales de cada grupo experimental se resuspendieron trozos de páncreas en 200 µl de agua bidestilada, se los sonicó y este material se conservó a -20° C para determinar el contenido de insulina por RIA. (Herbert V y col., 1965); los resultados se expresaron como ng de insulina/mg de proteína medida por el método de Bradford (1976) (BioRad, Hércules, CA, USA).

4.5 RT-PCR cuantitativa en tiempo real

4.5.1 Aislamiento de ARN total

Dado que la cantidad de tejido pancreático extraído de cada individuo resultó exigua para alcanzar una masa aproximada a los 100 mg, cada uno de estos grupos fue conformado con tejido extraído de embriones o crías gestados por la misma rata. Se aisló ARN total a partir del tejido pancreático entero de todos los grupos de animales (embriones y crías) empleando el método de Chomczynski y Sacchi modificado (Chomczynsky P, 1987): se homogeneizó el tejido con un equipo Ultraturrax en solución desnaturante (Promega) y se realizaron sucesivas extracciones fenólicas con posterior precipitación con alcohol isopropílico. El precipitado obtenido se resuspendió en clorhidrato de guanidina/β-mercaptoetanol y se volvió a precipitar con etanol 100%.

El ARN obtenido se lavó con etanol 70% y se lo resuspendió en 50 μ l de agua con DEPC para posteriormente realizar la valorización de su concentración por lectura de absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro (Shimadzu).

La posible contaminación con proteínas o fenol se controló midiendo en el mismo espectrofotómetro la relación de absorbancia 260/280 nm; la integridad del ARN aislado se controló mediante electroforesis en gel de agarosa-formaldehído al 1% (Sambrook J y col., 1989), verificándose la presencia de las bandas características de ARNr 28s y 18s; mientras que la eventual contaminación con ADN genómico se evitó realizando una digestión del ADN con ADNasa I 1U/ μ l (Invitrogen).

4.5.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Se realizó la transcripción reversa (RT) a partir de 1 μ g de ARN total en presencia de la enzima transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen), desoxi-nucleótidos trifosfatados (dNTP), di-tio-treitol (DTT), la enzima RNase-out (Invitrogen) que inhibe la acción de ribonucleasas y oligo-dT como cebadores. La inclusión de estos cebadores asegura que la reacción de RT se efectúe exclusivamente sobre los ARNm debido a que estos poseen una cola poli-adenilada.

La posible contaminación con ADN genómico se controló por PCR, utilizando el ARN tratado y sin tratar con enzima DNasa I.

4.5.3 Diseño de cebadores

Los cebadores fueron diseñados utilizando el programa "Primer3 v.0.4.0" (Rozen S & Skaletsky H, 2000; <http://frodo.wi.mit.edu/>) y se compararon con el genoma de rata utilizando Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar su especificidad.

La calidad teórica de los cebadores diseñados (posibilidad de formar horquillas, homo- o hetero-dímeros) se comprobó con el programa IDTDNA (Integrated DNA Technologies – SciTools – Oligo Analyzer 3.1) que tiene en cuenta la temperatura de fusión de ambos cebadores y la variación de energía libre de Gibbs (ΔG) para la formación de dímeros entre ambos cebadores. (IDTDNA: <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

Los cebadores fueron probados en PCR en un termociclador Biometra utilizando una mezcla de ADNc de ratas adultas, embriones y crías como molde de la enzima Platinum Taq ADN polimerasa (Invitrogen), en presencia de dNTPs (10mM) y Mg²⁺ (1,5 mM). El perfil de termociclos utilizados fue el siguiente: un ciclo de 3 min a 95° C, seguido de 39 ciclos con tres pasos cada uno, 30 seg a 95° C, 30 seg a 60° C y 45 seg a 72° C, seguido de un ciclo final de 10 min a 72° C. Los productos de la reacción de amplificación fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en

presencia de bromuro de etidio y posteriormente fotografiados con un equipo de fotografía digital Kodak con filtros UV.

Aún no ha sido descrita la secuencia del gen de INGAP en la rata; sin embargo, la secuencia del ADNc de Ingap de hámster posee una alta homología con el ADNc de REG3 β de rata; en consecuencia, decidimos incorporar un par de cebadores de Ingap de hámster (número de acceso en el banco de genes U41738) y otro de Reg3 β de rata (número de acceso en el banco de genes NM_053289). Paralelamente incorporamos un tercer par de cebadores capaz de amplificar ambos ADNc al que llamamos "DegR-I"; el mismo fue diseñado en base a las secuencias de los cebadores de Reg3 β a los que le fueron sustituidas aquellas bases que difieren entre ambos ADNc por bases degeneradas (ver Tablas 1 y 2). Para corroborar la calidad de los cebadores de Ingap, Reg3 β y DegR-I efectuamos PCRs utilizando ADNc de páncreas de rata y de islotes pancreáticos de hámster.

Base degenerada	Bases a las que sustituye
R	A, G
Y	C, T
M	A, C
K	G, T
S	C, G
W	A, T
H	A, C, T
B	C, G, T
V	A, C, G
D	A, G, T
N	A, C, G, T

Tabla 1: Códigos de las bases nitrogenadas modificadas químicamente (degeneradas) que al incorporarse a una secuencia de nucleótidos, son reconocidas como más de una de las cuatro bases habitualmente presentes en el ADN.

4.5.4 Secuenciación de fragmentos amplificados

Los fragmentos de ADN producidos por PCR con los cebadores Reg3 β (ADNc de hámster) y DegR-I (ADNc de rata) fueron aislados y purificados a partir de la banda obtenida en la electroforesis en gel de agarosa con el sistema de purificación de fragmentos de PCR de QIAgen (QIAquick PCR Purification kit. QIAgen) y posteriormente secuenciado en un secuenciador de ADN (Megabace 1000, GE Healthcare Life Sciences).

Cebador	Secuencia	Especie N° acceso banco de genes	Longitud fragmento amplificado
Ngn3 directo	5'- TCCAAGTGTCCCAAGAGACC -3'	Rata NM_021700	129 pb
Ngn3 reverso	5'- AGTCACCTGCTTCTGCTTCG -3'		
Reg3 β directo	5'- TGTCAACTGGGAGAGGAACC -3'	Rata NM_053289	128 pb
Reg3 β reverso	5'- ATTTGCAGACGTAGGGCAAC -3'		
Ingap directo	5'- TACCTTCGTGCCTCCCTTG -3'	Ingap U41738	110 pb
Ingap reverso	5'- ACTTCCATCCACTTCCGTTG -3'		
DegR-I directo	5'- YKWY AACTGGGAGAGGAACC -3'	Rata NM_053289 Hámster U41738	128 pb
DegR-I reverso	5'- ATTTGCAGAY RTAGGG MARC -3'		
Pdx-1 directo	5'- GGTGCCAGAGTTCAGTGCTA -3'	Rata NM_022852	112 pb
Pdx-1 reverso	5'- ACTTCCCTGTTCCAGCGTTC -3'		
β -actina directo	5'- AGAGGGAAATCGTGCGTGAC -3'	Rata NM_031144	138 pb
β -actina reverso	5'- CGATAGTGATGACCTGACCGT-3'		

Tabla 2: Secuencia de los cebadores, incluyendo información acerca de la especie y el número de acceso al banco de genes de los ADNc en base a los cuales fueron diseñados, así como la longitud en pares de bases (pb) de los fragmentos amplificados. En negrita se resaltaron las bases degeneradas incorporadas a los cebadores DegR-I.

4.5.5 PCR en tiempo real

El material utilizado como molde para la ADN polimerasa fue en todos los casos 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ del ADNc producido en la reacción de RT. Cada tubo de reacción fue amplificado con la mezcla 2X iQTM SYBR Green Supermix BIORAD en presencia de los cebadores (directo y reverso) específicos en una concentración de 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$.

El perfil de ciclos utilizado en el termociclador iCycler 5 (Biorad) fue el siguiente: 1 ciclo único de 3 min a 95° C seguido de 45 ciclos de tres pasos: 30 seg a 95° C, 30 seg a 60° C y 45 seg a 72° y un ciclo final de 10 min a 72° C. En cada ciclo se registró la intensidad de la fluorescencia emitida por cada uno de los tubos.

Al término de los ciclos de amplificación efectuamos una curva de fusión ("melting") en la que se aumentó la temperatura desde 55 a 90° C, tomando el registro de la fluorescencia cada medio grado de temperatura.

Se evaluó la eficiencia (E) individual de cada par de cebadores (Pdx-1, Ngn-3, Reg3 β y DegR-I) calculada con una curva estándar y el parámetro conocido como ciclo umbral o Ct (Ct proveniente del vocablo inglés "cycle threshold"). La curva estándar fue creada con diluciones seriadas de una mezcla de muestras de ADNc obtenidas del tejido pancreático de varias ratas normales (adultas, embriones y crías). El método de cuantificación elegido fue descrito por Pfaffl (2001), en el que se evalúan los niveles

de cada producto de amplificación en relación a los del estándar interno (β -actina) y entre los diferentes grupos experimentales.

4.6 Inmunohistoquímica

4.6.1 Procesamiento del material

Las muestras fijadas en formol por 24 h a 4-8° C fueron deshidratadas siguiendo la siguiente secuencia: primero se colocaron en alcohol 70°, luego en alcohol 96° y finalmente en alcohol absoluto. Luego, en la etapa de aclaramiento, se colocaron las muestras de páncreas en Xilol y finalmente se incluyeron en paraplast previo pasaje por una mezcla de Xilol/paraplast (50/50%) y finalmente 2 baños de paraplast. Posteriormente se entacaron y finalmente se cortaron con un micrótopo rotatorio Leica, obteniéndose secciones seriadas de 5 μ m de espesor de cada grupo experimental y de tres niveles diferentes (cada nivel necesitó desechar 50 cortes del bloque antes de pasar al siguiente nivel). Luego los cortes se montaron en portaobjetos silanizados (3- aminopropil) trietoxi-silano) o con carga eléctrica.

4.6.2 Desparafinado

Las muestras ya montadas en los portaobjetos y secadas en estufa a 40° C durante 24 h se desparafinaron en Xilol en dos tiempos sucesivos de 5 min. Luego se colocaron durante 30 min en una mezcla de metanol y peróxido de hidrógeno al 3% para evitar reacciones inespecíficas. Luego se colocaron durante 5 min en alcohol 96° y finalmente 5 min en buffer fosfato pH 7,1 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 26mM, NaCl 116mM, KH_2PO_4 11 mM).

4.6.3 Coloraciones

Hematoxilina: con el fin de estudiar la morfología general de los páncreas, cada portaobjeto se sumergió en hematoxilina durante 2 min y luego se lavó dejando correr agua bajo la canilla sobre el portaobjetos para retirar el excedente y producir el viraje del colorante.

Para todas las coloraciones inmunohistoquímicas descritas a continuación las secciones de páncreas desparafinadas fueron tratadas con suero porcino normal para evitar coloraciones inespecíficas.

PCNA/Insulina: se realizó una doble coloración para el antígeno de proliferación nuclear (PCNA; 1:500; Mouse; Sigma) e insulina (células β), empleando nuestro propio anticuerpo anti- insulina desarrollado en cobayo a una concentración de 1:20.000.

Primero se realizó la coloración para el anticuerpo PCNA con el cual se incubó toda la noche a 4° C. Previo a la incubación con el anticuerpo primario se efectuó la recuperación antigénica del páncreas fijado en formol, mediante la utilización del recuperador de antígenos de laboratorios DAKO; luego se siguió el método del complejo biotina-estreptavidina-peroxidada utilizándose carbazola como revelador (rojo). Luego, sobre el mismo portaobjetos incubamos 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo anti-insulina y seguimos el método del complejo biotina-estreptavidina-fosfatasa utilizando en este caso Fast blue (azul) como revelador

PDX-1/INGAP: se realizó una doble coloración para PDX-1(1:4000; guinea pig; gentilmente provisto por el Dr. C. Wrigth, Department of Cell Biology Vanderbilt University, Nashville, EE.UU.) e INGAP (1:300; anti-INGAP 1246 anti-conejo gentilmente donado por el Dr. A. Vinik del Strelitz Diabetes Institute, The Research Institute at Eastern Virginia Medical School Norfolk). Primero se realizó la coloración de PDX-1 mediante incubación de toda la noche a 4° C. Previo a la incubación con el anticuerpo primario se efectuó la recuperación antigénica del páncreas fijado en formol, mediante la utilización del recuperador de antígenos de laboratorios DAKO y luego se siguió el método del complejo biotina-estreptavidina-peroxidada utilizando carbazola como revelador (rojo). Luego en el mismo corte se coloreó INGAP, incubando una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario utilizando el método del complejo biotina-estreptavidina con fosfatasa y Fast blue como revelador (azul).

NKX6.1/ no β : se realizó doble coloración para NKX6.1 (1:1000; con el anticuerpo anti Nkx6.1 desarrollado en conejo provisto por el Dr. O. Madsen del Hagerdon Research Institute) y no β , utilizando una mezcla de los anticuerpos glucagon, somatostatina y polipéptido pancreático (anti-glucagon; 1:3000; anti conejo; Novo Nordisk; anti-somatostatina; 1:150; anticonejo; Dako; y antipolipéptido pancreático; 1:6000; anticonejo; Dako). Primero se realizó la coloración con anti-NKX6.1 para lo cual se incubó durante toda la noche a 4° C y previo a la incubación con el anticuerpo primario se efectuó la recuperación antigénica del páncreas fijado en formol, mediante la utilización del recuperador de antígenos de laboratorios DAKO y luego se siguió el método del complejo biotina-estreptavidina-peroxidada utilizando carbazola como revelador (rojo). Luego, en el mismo vidrio, coloreamos las células no β previa incubación durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario, utilizando el método del complejo biotina-estreptavidina-fosfatasa con Fast blue como revelador (azul).

NGN-3/ no β : se realizó una doble coloración para NGN3 (1:1000; anti-NGN-3 anti conejo provisto por el Dr. German de Nashville) y un pool de anticuerpos contra células no β , idéntica a la antes descrita. Primero se realizó la coloración de Ngn3 incubado durante toda la noche a 4° C, luego se incubo 30 min a temperatura ambiente con biotina para finalmente incubarse por espacio de media hora con estreptavidina peroxidada utilizando carbazola como revelador (rojo). Luego, en el mismo vidrio, coloreamos las células no β incubando durante una hora a temperatura ambiente con la mezcla de los anticuerpos primarios utilizando el método del complejo biotina-estreptavidina-fosfatasa con Fast blue como revelador (azul).

CK19: se realizó una coloración simple para determinar neogénesis utilizando el anticuerpo monoclonal anti-CK19 a una dilución de 1:40 (Sigma) por una hora. Previo a la incubación con el anticuerpo primario, se efectuó la recuperación antigénica del páncreas fijado en formol, mediante la utilización del recuperador de antígenos de laboratorios DAKO. Posteriormente se utilizó el método del complejo biotina-estreptavidina-peroxidasa (incubados por 30 min cada paso) utilizándose finalmente carbazola como revelador (rojo).

Detección de Apoptosis: los cortes fueron lavados en PBS 7.1 antes de incubar, durante 30 min, en cámara oscura y húmeda, con solución de yoduro de propidio (4 μ g/7ml; Sigma) y Ribonucleasa A (100 μ g/ml; Sigma). Luego las secciones pre-tratadas con suero no inmune de cobayo (1:50) diluido en buffer Tris (pH 7,4) fueron incubadas durante una hora con el anticuerpo anti-insulina (1:50). Posteriormente los portaobjetos se lavaron con PBS 7.1 tres veces por 7 min cada vez, luego de lo cual se llevo a cabo una segunda incubación a temperatura ambiente durante 45 min en la oscuridad con el anticuerpo específico (anti-insulina de cobayo 1:50) conjugado con fluoresceína. Luego de nuevos lavados con PBS, las secciones se montaron en Tris glicerol (pH 8,4) y se analizaron empleando un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiolab equipado con lámpara de mercurio HB050 y con dos filtros diferentes, para visualizar la autofluorescencia (yoduro de propidio) y la fluorescencia del anticuerpo anti-insulina revelado con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

4.6.4 Análisis morfométrico

El análisis morfométrico se realizó mediante videomicroscopía utilizando un microscopio binocular de luz Nikon Eclipse 80i en combinación con un sistema Nikon digital DS-U1 y programa de análisis de imágenes OPTIMAS (Bioscan Incorporated, Edmons, WA, USA).

Se midieron los siguientes parámetros:

área de páncreas total excluyendo tejido conectivo,
área y número de células β y no β ,
área y número de células PDX-1 positivas,
área y número de células INGAP-positivas,
número de células NKX 6.1 positivas en los animales adultos,
área y número de células positivas a CK19 (marcador de neogénesis),
número de células NGN-3 positivas en los fetos.

Luego se calculó:

Índice de replicación de células β mediante el análisis del porcentaje de células PCNA (antígeno de proliferación nuclear celular) positivas respecto al número total de células β ,
índice de muerte celular β a través de la determinación del porcentaje de células positivas a yoduro de propidio-insulina,
densidad de volumen (Vvi) o volumen relativo de diferentes parámetros expresado en % como resultado de dividir el área del marcador de interés por el área de páncreas total multiplicado x 100,
masa de células β , no β , CK19, PDX-1 e INGAP como resultado de multiplicar el peso del páncreas por la densidad de volumen del marcador correspondiente,
masa de células extrainsulares (se consideró extrainsular a grupos de menos de cinco células); se multiplicó el peso del páncreas por la densidad de volumen de las células extrainsulares,
tamaño de los islotes a partir de medir el área de cada islote,
tamaño de células β luego de dividir el área total de células β por el número de núcleos de células β ,
número de células β por islote a partir de la cuantificación del número de núcleos de células insulina-positivas en cada islote,
número de islotes por mm^2 a partir de dividir el número de islotes por corte de páncreas total y referirlo a la unidad de área.

4.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el test t de Student para muestras independientes no apareadas. Las diferencias se consideraron significativas cuando la probabilidad (p) era menor a 0,05. Los datos son expresados como la media \pm el error estándar de la media (EEM).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 FETOS Y RECIÉN NACIDOS

5.1.1 Animales

El peso de los ejemplares de distintas edades (E17, E19 días y P7) fue significativamente diferente, alcanzando el valor máximo a la semana de vida, con un incremento de alrededor de 6 veces respecto al registrado en el día 19 y de 14 veces a los 17 días de gestación. El menor valor se registró a los 17 días de gestación ($p < 0,05$). También se registró un incremento significativo en el peso de los páncreas acorde con el progreso de la gestación ($p < 0,05$). El porcentaje de peso del páncreas respecto del peso del animal fue de 0,2% en todos los grupos (Tabla 3).

Tabla 3: Peso animal y peso del páncreas

Grupo	Peso animal (g)	Peso páncreas (mg)
E17	0,85 ± 0,03 a	1,70 ± 0,07 a
E19	1,84 ± 0,04 b	3,68 ± 0,08 b
P7	12,31 ± 0,22 c	24,07 ± 1,05 c

Incremento del peso corporal y peso de los páncreas en diferentes edades
a: E17 vs. E19 y P7; b: E19 vs. E17 y P7; c: P7 vs. E17 y E19; $p \leq 0,05$;
n=15 en cada grupo. Los valores representan la media ± EEM

5.1.2 Datos bioquímicos

Los valores de las glucemias fueron significativamente mayores en las crías de una semana respecto del resto de los grupos ($p < 0,05$). El contenido de insulina pancreática fue similar en todos los grupos (Tabla 4).

Tabla 4: Glucosa en plasma y contenido de insulina en páncreas

Grupo	Glucemia (mg%)	Contenido de insulina (ng/mg proteína)
E17	61,8 ± 3,08	1,5 ± 0,96 NS
E19	56,6 ± 2,4	2,9 ± 0,3 NS
P7	88,13 ± 0,9 a	2,7 ± 0,9 NS

a: P7 vs. E17 y E19; $p \leq 0,05$; n=15 en cada grupo.
Los valores representan la media ± EEM

5.1.3 Secreción de insulina "in vitro"

En el grupo E17, la secreción de insulina en respuesta a glucosa 16,6mM no aumentó significativamente sobre el valor basal (glucosa 3,3mM), mientras que sí lo hizo frente al estímulo de arginina 10mM; $p < 0,05$) (Figura 8, izquierda).

Algo similar ocurrió en el grupo E19: no se observaron diferencias significativas en la secreción de insulina frente a glucosa 3,3mM y glucosa 16,6mM; la secreción de insulina aumentó cuando se utilizó arginina como estímulo (Figura 8, centro).

En el grupo P7, registramos un aumento significativo de la secreción de insulina en respuesta a glucosa 16,6 mM y arginina respecto al basal (glucosa 3,3 mM), no observándose diferencias en presencia del estímulo de glucosa 16,6mM y arginina 10mM (Figura 8, derecha).

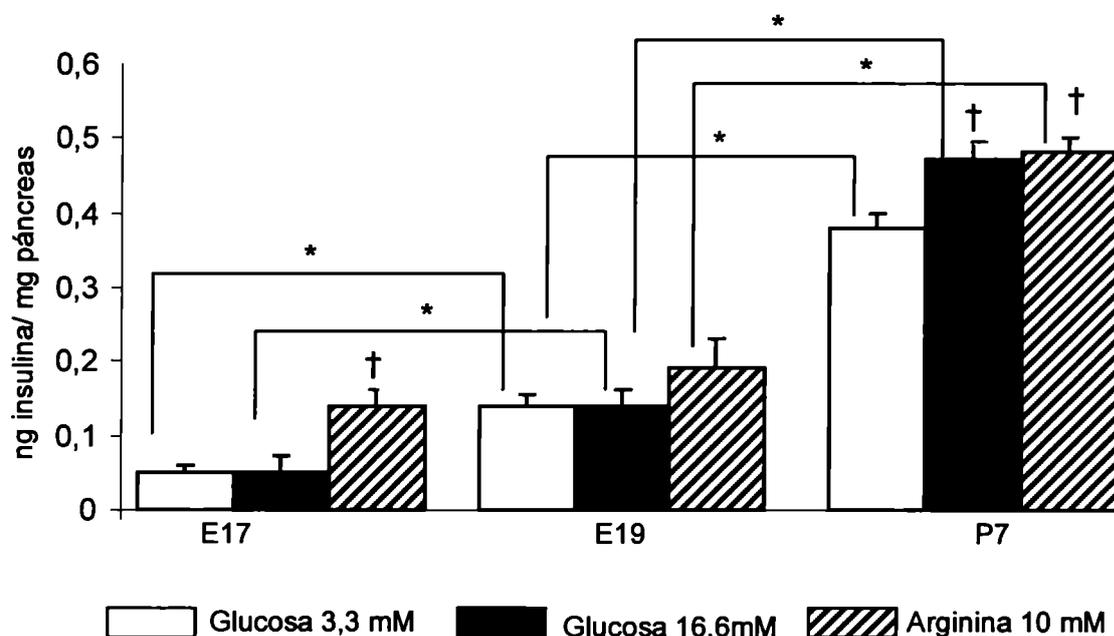


Figura 8: Secreción de insulina *in vitro* en respuesta a diferentes estímulos. $n = 6$ en cada grupo * $p < 0,05$ con el mismo estímulo entre grupos † $p < 0,05$ respecto del basal, dentro del mismo grupo. Los valores representan la media \pm EEM

La secreción de insulina en presencia de glucosa 3,3mM y 16,6mM mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos estudiados ($p < 0,05$) (Figura 8).

La secreción de insulina en respuesta a arginina 10 mM aumentó significativamente en las crías de una semana respecto del resto de los grupos ($p < 0,05$) (Figura 8).

b. Cebador directo Reg3 β : 5' - **TGTC**AACTGGGAGAGGAACC- 3'
 Secuencia ADNc de Ingap: 5' - **CTATA**ACTGGGAGAGGAACC- 3'
 Cebador directo DegR-I: 5' - **YKWYA**ACTGGGAGAGGAACC- 3'

 Cebador reverso Reg3 β : 5' - ATTTGCAGAC**GTAGGGCAAC** -3'
 Secuencia ADNc de Ingap: 5' - ATTTGCAGAT**TATAGGGAAGC** -3'
 Cebador reverso DegR-I: 5' - ATTTGCAGAY**XTAGGGMARC** -3'

Figura 9: Apilamiento de la secuencia de los ADNc de REG3 β de rata (gi|16757981|ref|NM_053289.1) y de Ingap de hámster (gi|1514681|gb|U41737.1|HSU4173), efectuado con el soporte Clustal-W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Con línea entera se muestra la secuencia de los cebadores de Ingap, con línea ondulada la de los cebadores de Reg3 β y con * se indicaron las bases que coinciden en ambas secuencias (a). Las primeras 4 bases del cebador directo de Reg3 β y 4 de las bases del cebador reverso no coinciden con las de Ingap; en consecuencia, se sustituyeron estas bases por las correspondientes bases degeneradas para diseñar el par de cebadores DegR-I (b).

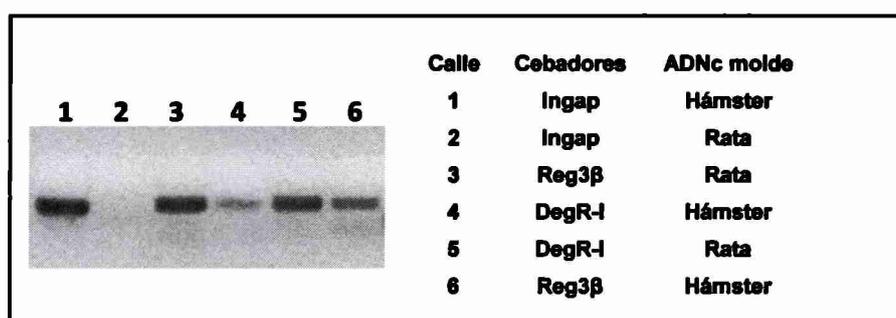
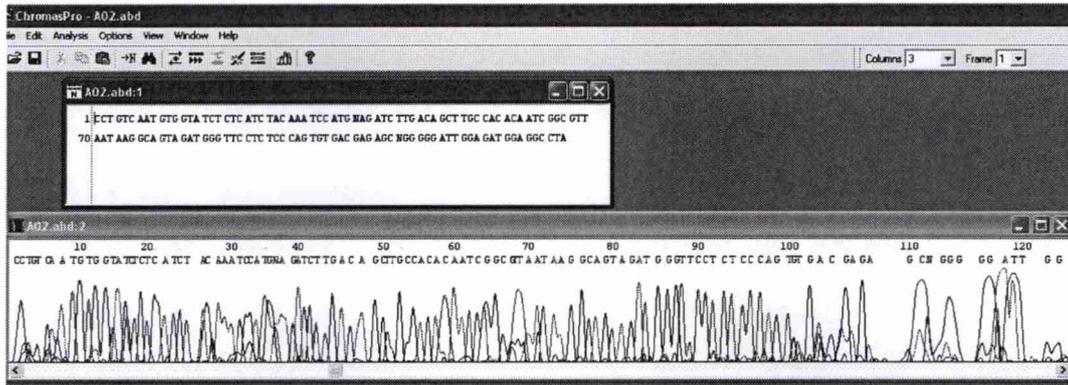


Figura 10: PCR de punto final con los cebadores de Ingap, Reg3 β y DegR-I usando como molde ADNc de islotes pancreáticos de hámster o de páncreas de rata M0.

Los cebadores de Ingap sólo funcionaron con el molde de hámster, el del Reg3 β funcionó con los moldes de hámster y rata y el DegR-I mostró una banda muy intensa con el molde de rata y una de menor intensidad con el molde de hámster (Figura 10).

Se secuenció el producto amplificado en la PCR con el ADNc de rata y los cebadores DegR-I. Los resultados obtenidos se compararon con los ADNc del banco de genes (Blast, Pubmed). Paralelamente, se compararon (apilamiento de secuencias) las secuencias obtenidas con la correspondiente al de Reg3 β de rata e Ingap de hámster (Figura 11). Puede verse que la secuencia de 107 bases obtenida a partir de la secuenciación del fragmento amplificado por los cebadores DegR-I presenta 100 coincidencias (93,5%) con la región de Reg3 β con la cual se diseñaron los cebadores. Las 68 coincidencias con la secuencia de Ingap corresponden a bases que también coinciden con la de Reg3 β , lo que sugiere que el fragmento amplificado con los cebadores DegR-I corresponde a Reg3 β . Por otro lado, se secuenció el producto amplificado con los cebadores Reg3 β utilizando como molde ADNc de hámster y se obtuvo un 97% de coincidencias con la secuencia correspondiente al Reg3 β de rata.

a.



```

Secuencia PCR -----CTACTGGCTTAGAC-GCGGATCTTGTGGC 28
Reg3β rata TCAACTGGGAGAGGAACCCATCTACTGCCTTAGACCGGGATTCTGTGGC 500
Ingap Hámster ATAACTGGGAGAGGAACCCCTCTATTGCTGCTGACCGTGGTTATTGTGCA 434
                *** **      *** * * * * *
Secuencia PCR AGCTTGTCAGATCTTCTTGGATTCTAAGCATGGAGAGATACCACATGTG 78
Reg3β rata AGCTTGTCAGATCTTCTTGGATTCTAAG-ATGGAGAGATACCACATGTG 549
Ingap Hámster GTTTGTCTCAGAAATCAGGTTTTCAGAA-GTGGAGAGATTTAATTGTG 483
                ***** * ***** * * * * *
Secuencia PCR AAGTGAAGCTGCCCTACGTCTGCAAATACCCGGG-----ATTCTCT--- 118
Reg3β rata AAGTGAAGTTGCCCTACGTCTGCAAATTTACAGGTTAAA--ATTACCAGA 597
Ingap Hámster AAAATGAGCTTCCTTATATCTGCAAATTC AAGGTTAGGGCAGTTCTAAT 533
                ** * * * * * * * * * * * * * * *
Identities: 67 de 107
  
```

```

Secuencia PCR -----CTACTGGCTTAGAC-GCGGATCTTGTGGCAGCTTGTGATCTTC 44
Ingap Hámster CCCCTCTATTGCTGCTGACCGTGGTTATTGTGCAGTTTTGTCTCAGAAA- 449
                *** **      *** * * * * * * * * * * * * * * * *
Secuencia PCR TTGGATTCTAAGCATGGAGAGATACCACATGTGAAGTGAAGCTGCCCTA 94
Ingap Hámster TCAGGTTTTCAGAAAGTGGAGAGATTTAATTGTGAAAATGAGCTTCCCTA 499
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Secuencia PCR CGTCTGCAAATAC-----CCGGGATTCCT----- 118
Ingap Hámster TATCTGCAAATTC AAGGTTAGGGCAGTTCTAATTTCAACAGCTTGAAA 549
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * *
Identities: 68 de 107 Bases faltantes (gaps): 6+1 de 107
  
```

```

Secuencia PCR -----CTACTGGCTTAGAC-GCGGATCTTGTGGC 28
Reg3β rata TCAACTGGGAGAGGAACCCATCTACTGCCTTAGACCGGGATTCTGTGGC 500
                ***** ***** ***** *****
Secuencia PCR AGCTTGTCAGATCTTCTTGGATTCTAAGCATGGAGAGATACCACATGTG 78
Reg3β rata AGCTTGTCAGATCTTCTTGGATTCTAAG-ATGGAGAGATACCACATGTG 549
                ***** * ***** ***** *****
Secuencia PCR AAGTGAAGCTGCCCTACGTCTGCAAATACCCGGG-----ATTCTCT----- 118
Reg3β rata AAGTGAAGTTGCCCTACGTCTGCAAATTTACAGGTTAAAATACCAGACA 599
                ***** ***** ***** * * * * *
Identities: 100 de 107 Bases faltantes 6+1 de 107
  
```

Figura 11: a. Secuencia del fragmento de PCR amplificado con los cebadores DegR-I. La imagen muestra el perfil de picos de fluorescencia informado por el ChromasPro A02. b. Apilamientos de secuencias con el programa ClustalW 2. Fragmento de PCR/Reg3β/INGAP; Fragmento de PCR/INGAP y Fragmento de PCR/Reg3β. * indica bases coincidentes, - indica base faltante. Las 68 coincidencias entre Ingap y el fragmento amplificado están comprendidas dentro de las 100 existentes entre el fragmento de PCR y Reg3β.

El análisis cuantitativo por RT-PCR en tiempo real del nivel de transcripción del gen de Pdx-1 no mostró diferencias significativas entre las crías de una semana y los embriones de 17 días, pero aumentó significativamente en los embriones de 19 días respecto de los grupos restantes ($p < 0,05$) (Figura 12).

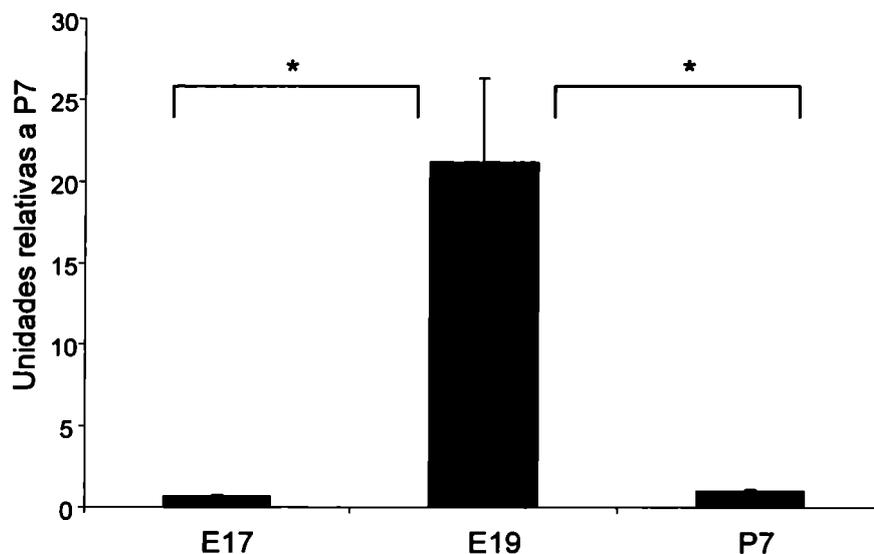


Figura 12: PCR en tiempo real para Pdx-1 utilizando como molde de reacción los ADNc obtenidos a partir de ARN total de páncreas de E17, E19 y P7. * $p < 0,05$. Los valores representan la media \pm EEM.

Los niveles de ARN mensajero de Ngn-3 registrado fueron más altos en los embriones de 17 días, aunque estas diferencias fueron solamente significativas respecto de P7 ($p < 0,05$) (Figura 13).

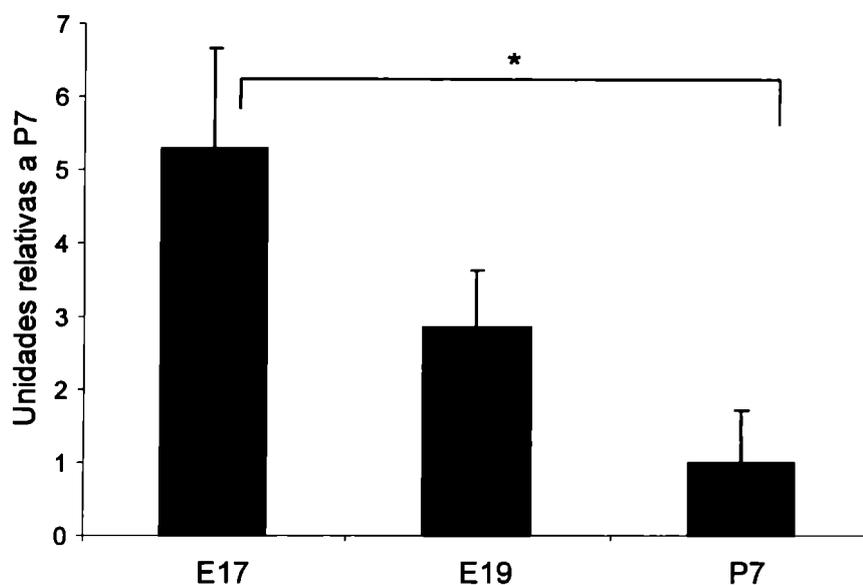


Figura 13: PCR en tiempo real para Ngn-3 utilizando como molde de reacción los ADNc obtenidos a partir de ARN total de páncreas de E17, E19 y P7. * $p < 0,05$. Los valores representan la media \pm EEM.

Los cebadores de Ingap no amplificaron ninguna región de los ADNc de rata (ver materiales y métodos); consecuentemente, analizamos los niveles del ARN mensajero de Reg3 β y el producto amplificado al utilizar un par de cebadores degenerados que coincide tanto con la secuencia de éste último como con el de Ingap. La cuantificación de los productos amplificados por ambos pares de cebadores (Reg3 β y DegR-I) mostró un perfil idéntico. Los ADNc de embriones E19 mostraron un aumento significativo respecto de E17 y P7, y a su vez los niveles alcanzados con el ADNc de E17 fueron significativamente mayores que los de P7 ($p < 0,001$) (Figuras 14 y 15).

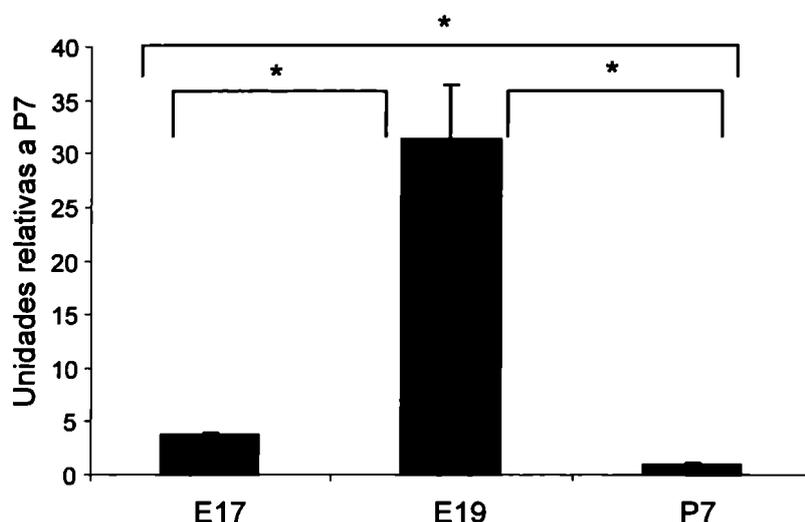


Figura 14: PCR en tiempo real para Reg3 β utilizando como molde de reacción los ADNc obtenidos a partir de ARNtotal de páncreas de E17, E19 y P7. * $p < 0,001$. Los valores representan la media \pm EEM.

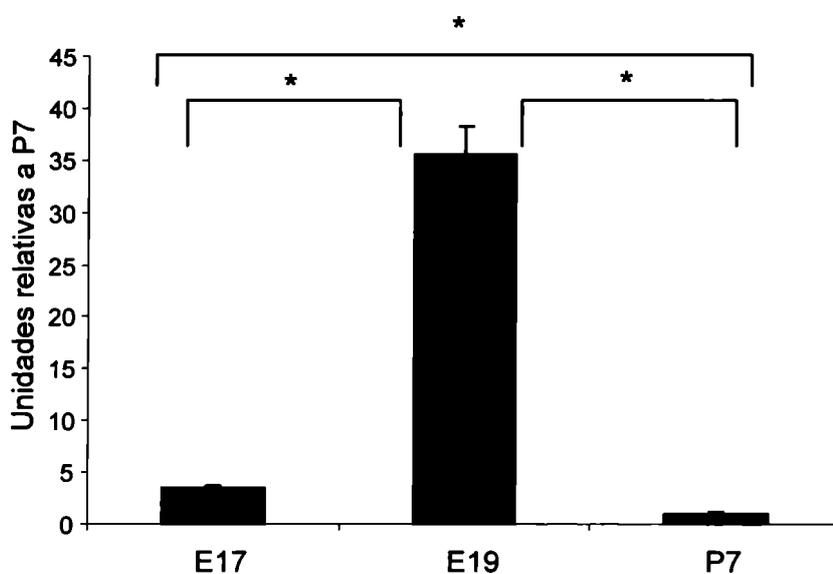


Figura 15: PCR en tiempo real para DegR-I utilizando como molde de reacción los ADNc obtenidos a partir de ARN total de páncreas de E17, E19 y P7. * $p < 0,001$. Los valores representan la media \pm EEM.

5.1.5 Estudios morfológicos y morfométricos

5.1.5.1 Morfología general de los páncreas

Los páncreas de E17 teñidos con hematoxilina mostraron una mayor proporción de tejido conectivo respecto de E19 y gran cantidad de acinos pancreáticos (Figura 16). En ambos grupos, las células β se presentaron agrupadas pero no mostraron la organización característica del islote maduro con las células β ubicadas centralmente. Esta disposición de las células insulares y la arquitectura del páncreas adulto se observó recién en las crías de una semana (P7).

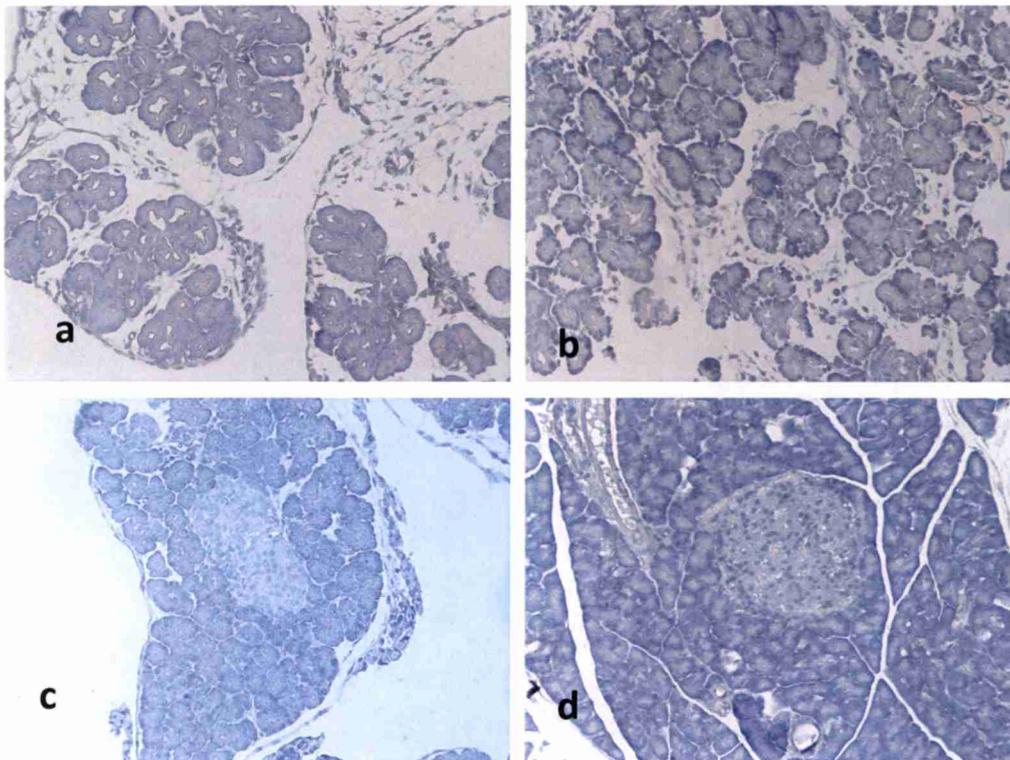


Figura 16: Secciones de páncreas coloreados con hematoxilina que permiten visualizar la arquitectura pancreática a las diferentes edades. a-E17 (40X), b-E19 (40X), c-P7 (20X), d-adulto (20X).

5.1.5.2 Ontogenia del INGAP

Se identificaron células INGAP positivas en el grupo E17, E19 y P7 y en los animales adultos pero no en el grupo E11, estadio en el cual las células aún permanecen indiferenciadas (Figura 17).

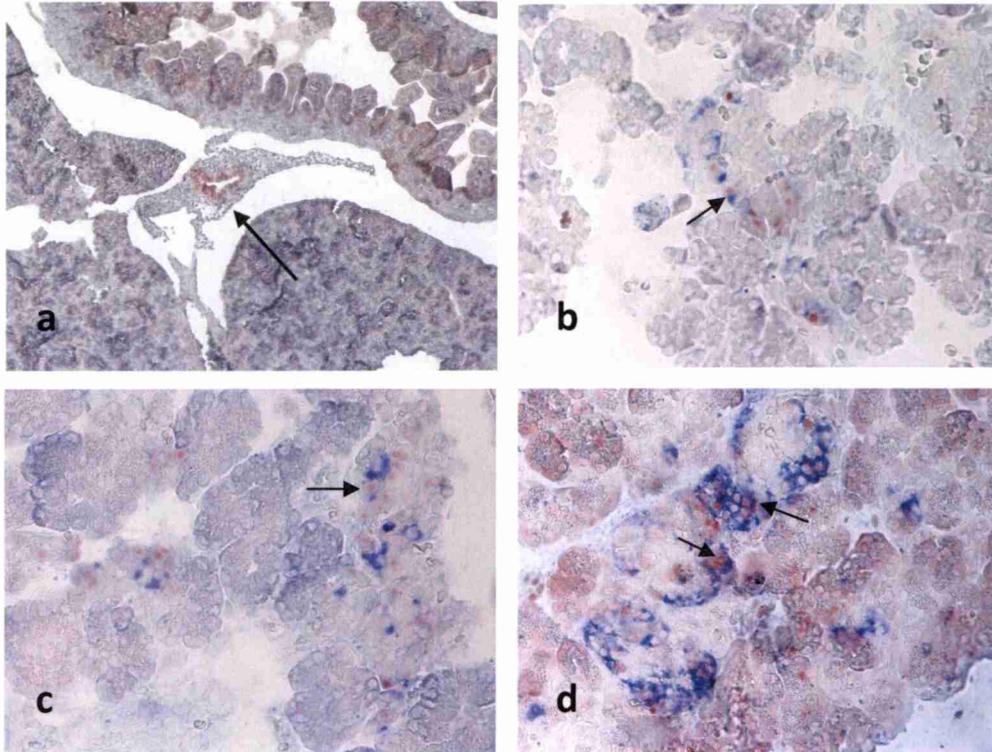


Figura 17: Secciones de páncreas. Inmunocoloración con INGAP (azul citoplasmático) y PDX (rojo nuclear). a- E11 (10X): se realizó inmunomarcación con INGAP (azul) y una tinción de fondo con hematoxilina para evidenciar las estructuras morfológicas. Nótese la falta de reactividad contra el anticuerpo mencionado. La flecha marca el brote pancreático. b-E17 (40X), c-E19 (40X), d- P7(40X): Las flechas indican células que coexpresan PDX-1/ INGAP.

5.1.5.3 Morfometría insular

El tamaño de los islotes del grupo P7 fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que el registrado en los islotes de E17 y E19 (Figuras 18).

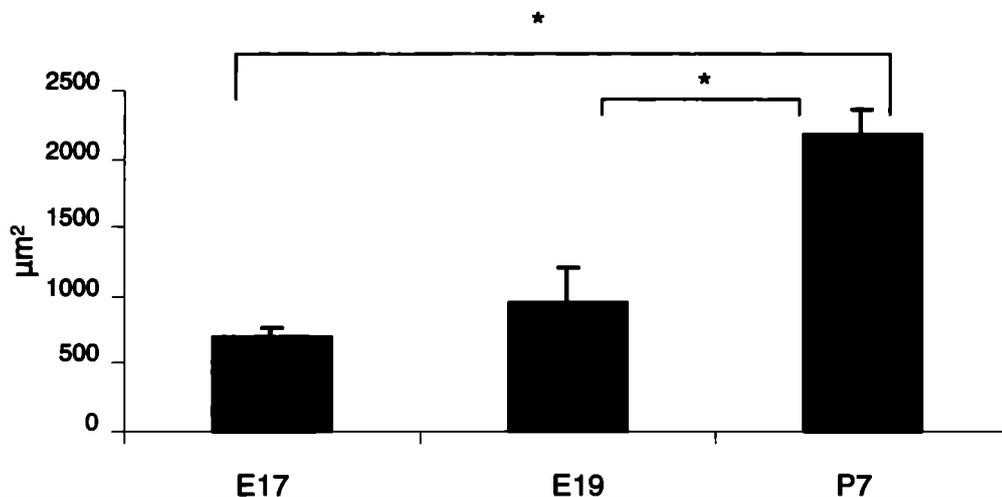


Figura 18: Tamaño insular. * $p < 0,05$ $n = 3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

El número de islotes por unidad de área, en cambio, no fue diferente entre los diferentes grupos (Figura 19).

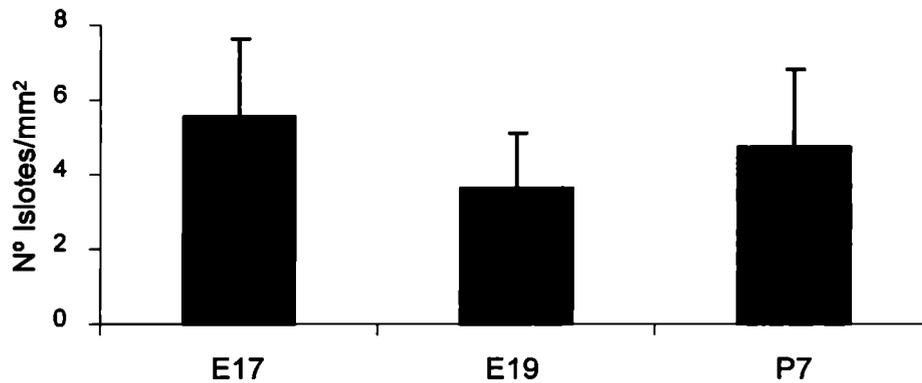


Figura 19: Número de islotes por unidad de área (mm²). n=3 animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media ± EEM.

Tampoco hubo diferencias significativas entre los diversos grupos en el tamaño de las células β (Figura 20).

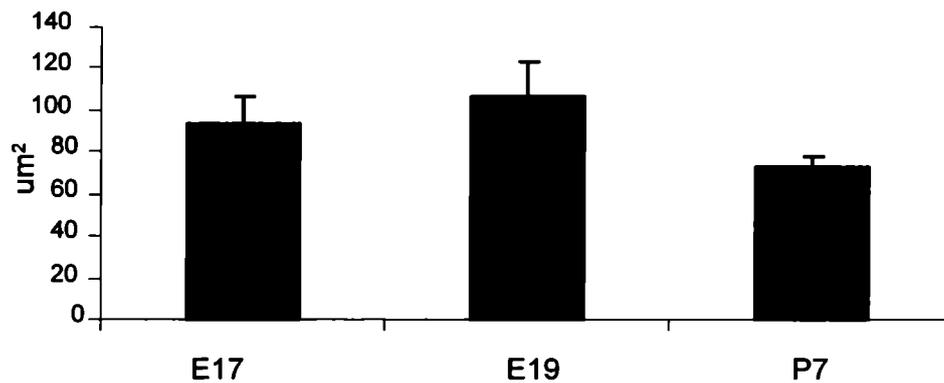


Figura 20: Tamaño de las células β ; n=3 animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media ± EEM

En los animales P7, el número de células β por islote aumentó aproximadamente 4 veces comparados con los islotes de E19 y 3 veces respecto de los islotes de E17 (Figura 21).

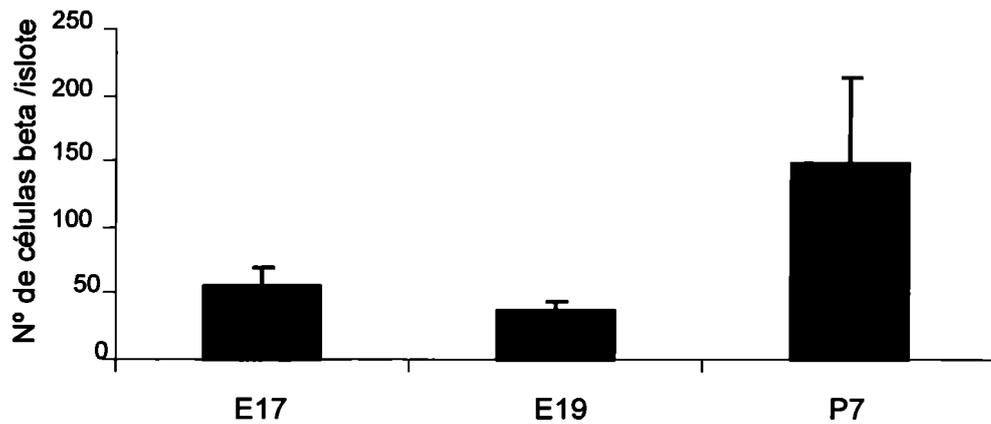


Figura 21: Número de células β por islote. $n=3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM

Estos datos sugieren que el mayor tamaño de los islotes, observado en los animales P7, estaría determinado por un incremento en el número y no en el tamaño de las células β insulares (hiperplasia y no hipertrofia).

5.1.5.4 Masa de células insulares y células β extrainsulares

La masa de células β insulares fue significativamente mayor ($p<0,05$) en P7 respecto del resto de los grupos, siendo E17 el de menor valor y significativamente diferente ($p<0,05$) respecto a E19 (Figuras 22 y 23).

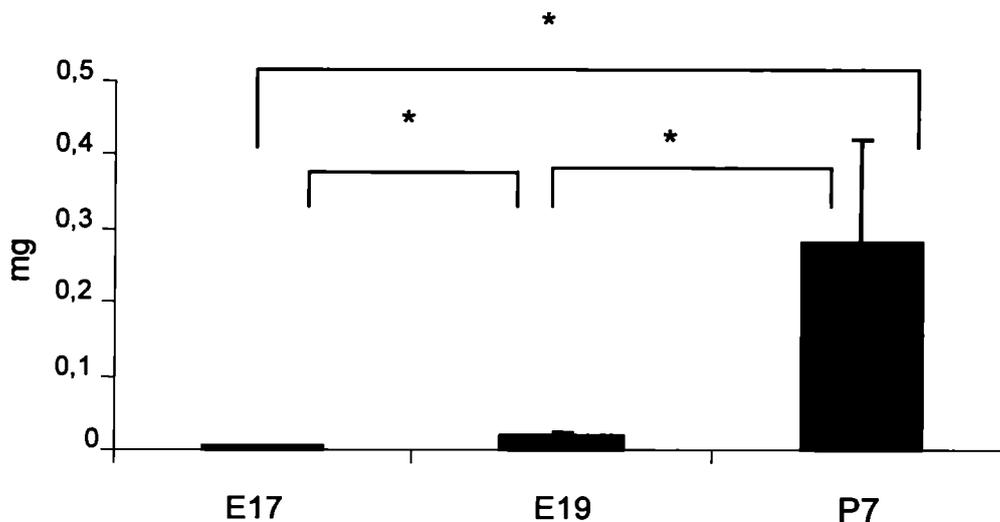


Figura 22: Masa de células β insulares. $*p<0,05$ $n=3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

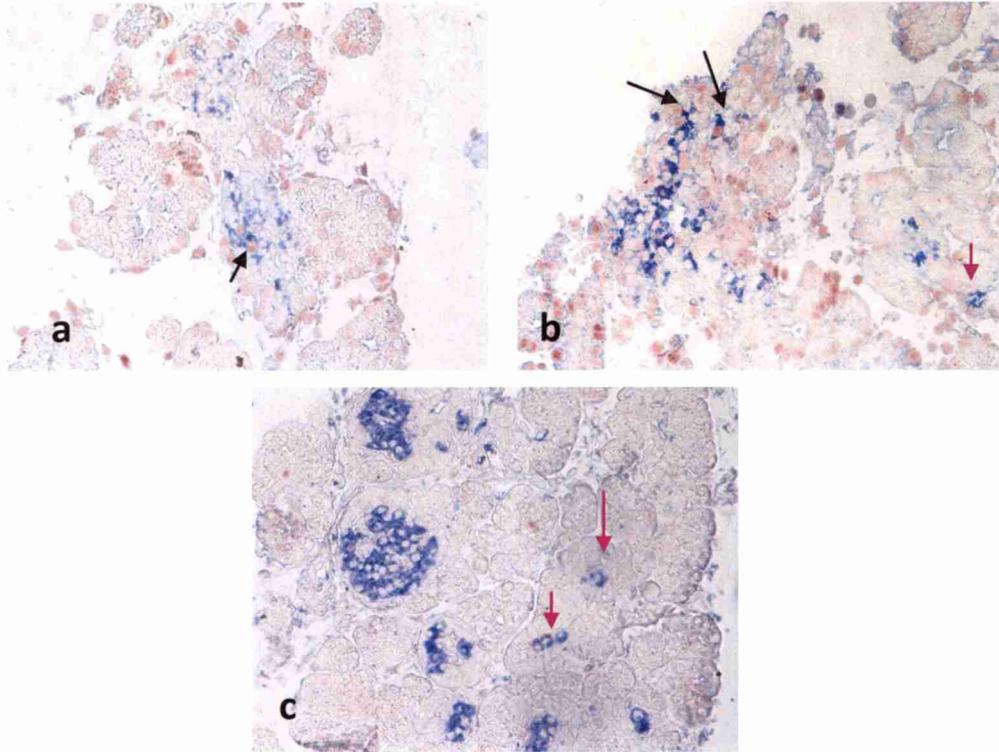


Figura 23: Secciones de páncreas. Inmunomarcación para insulina (azul citoplasmático) y PCNA (rojo nuclear). Nótese la distinta cantidad de células inmunomarcadas con insulina a medida que avanza la edad del animal. Con flechas negras se indican las células β en replicación. Con flechas rosadas se indican las agrupaciones de células β extrainsulares. a- E17(40X), b-E19(40X), c-P7(40X).

La masa de células β extrainsulares aumentó significativamente en P7 respecto de E17 y E19 ($p < 0,05$) (Figuras 23 y 24).

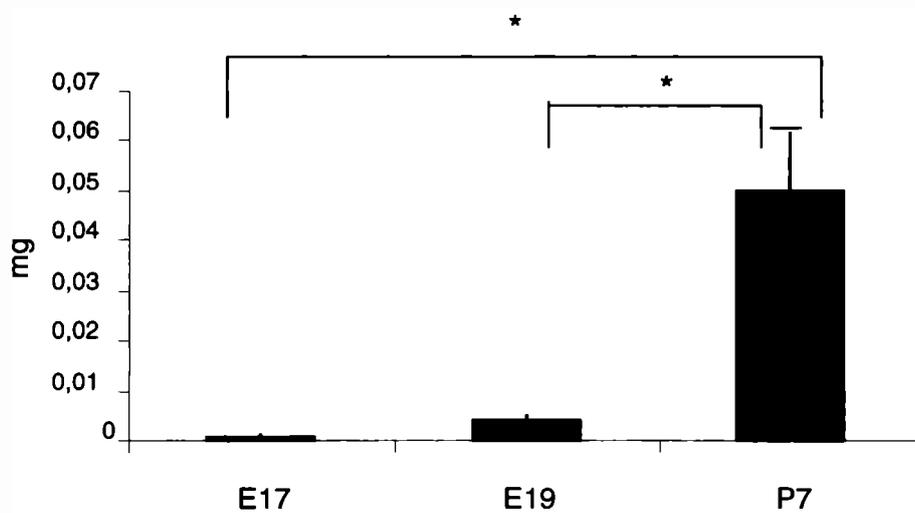


Figura 24: Masa de células β extrainsulares. * $p < 0,05$ $n = 3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

La masa de células β total (fracción insular y extrainsular) mostró un incremento significativo con el avance de la edad ($p < 0,05$) (Figura 23 y 25).

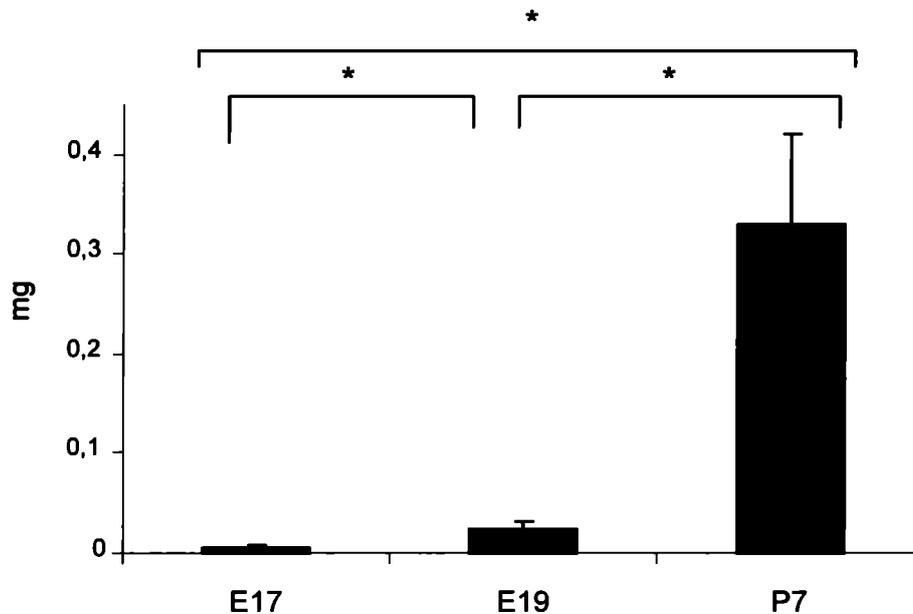


Figura 25: Masa de células β total. * $p < 0,05$ $n = 3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

Por el contrario, la masa de células no- β fue menor en P7 y mayor en E17 (Figuras 26 y 30).

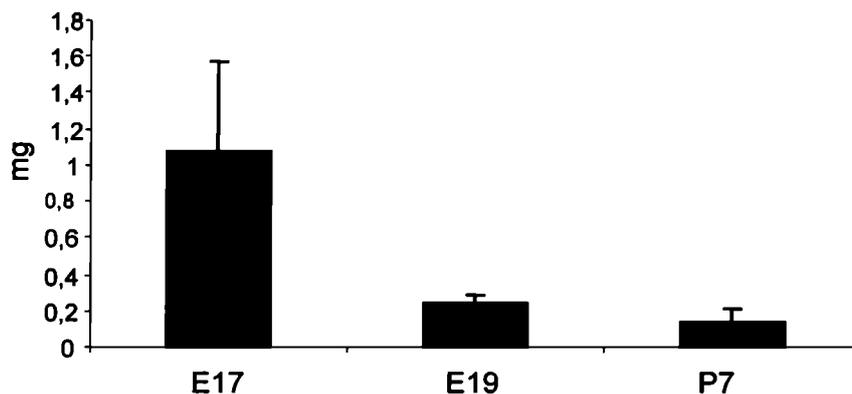


Figura 26: Masa de células no β . $n = 3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM

5.1.5.5 Replicación de células β

La tasa de replicación de células β disminuyó en P7 respecto de los restantes grupos, pero la diferencia sólo fue significativa comparada con el grupo E17 ($p < 0,05$) (Figuras 23 y 27).

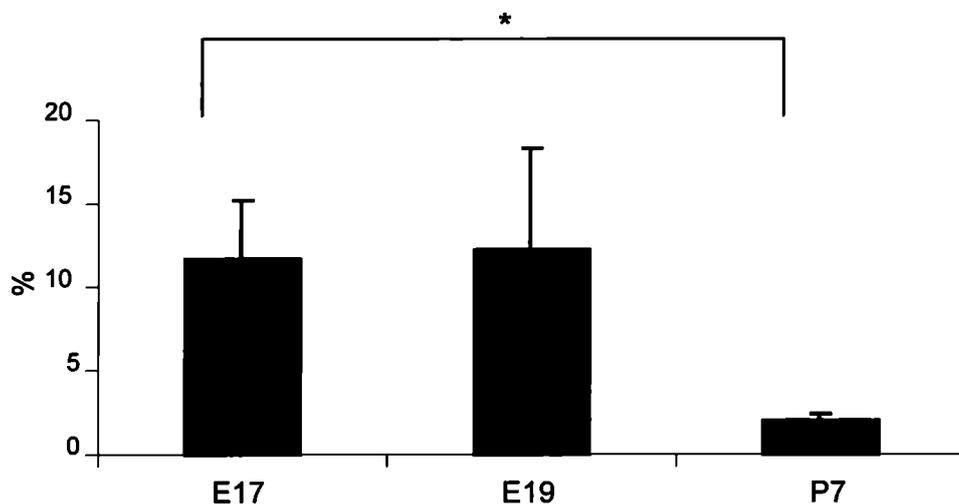


Figura 27: Tasa de replicación de células β . * $p < 0,05$ $n=3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

5.1.5.6 Marcadores de diferenciación endócrina

El número de células PDX-1-positivas aumentó en E19 respecto de E17 y fue significativamente mayor en P7 respecto de ambos grupos ($p < 0,05$) (Figuras 8 y 28).

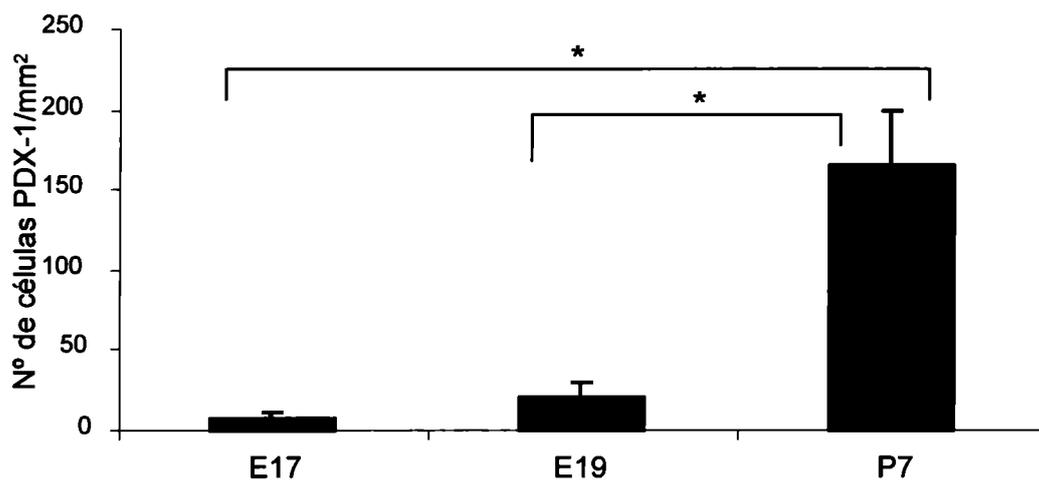


Figura 28: Número de células PDX-1-positivas por unidad de área (mm^2). * $p < 0,05$ $n=3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

En cambio, el número de células Ngn3-positivas fue significativamente menor en E19 respecto de E17 y no se observaron células positivas en P7 ($p < 0,05$) (Figuras 29 y 30).

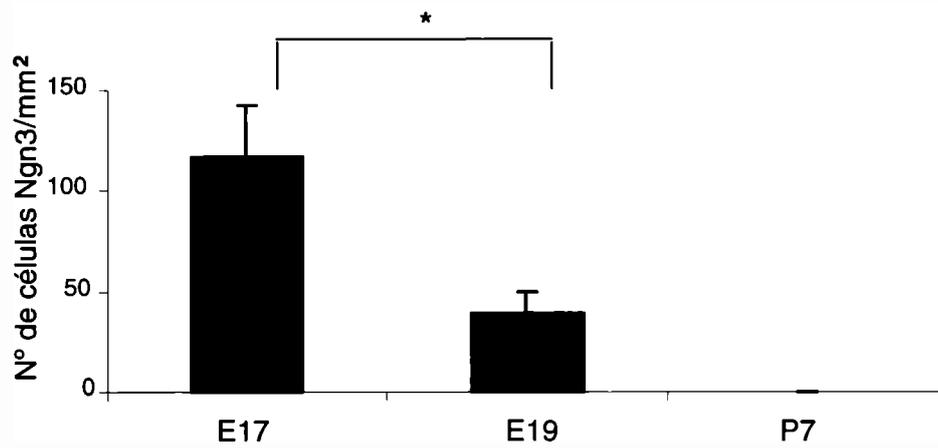


Figura 29. Número de células Ngn3 positivas por unidad de área (mm^2).
 * $p < 0,05$ $n=3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

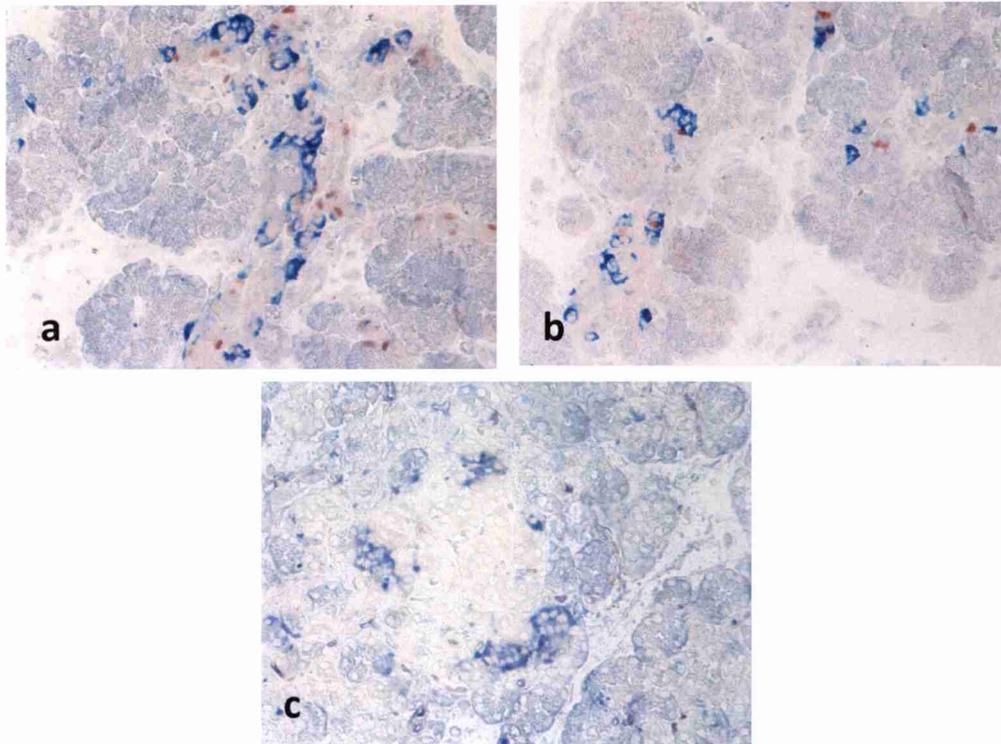


Figura 30: Secciones de páncreas. Inmunocoloración para células no- β en azul citoplasmático (glucagón, polipéptido pancreático, somatostatina) y para Ngn3 en rojo nuclear. a-E17(40X), b-E19(40X), c-P7(40X).

5.1.5.7 Marcadores de neogénesis insular

La masa de CK19 se incrementó significativamente entre E17 y E19, siendo además P7 significativamente mayor que ambos grupos ($p < 0,05$) (Figuras 31 y 32).

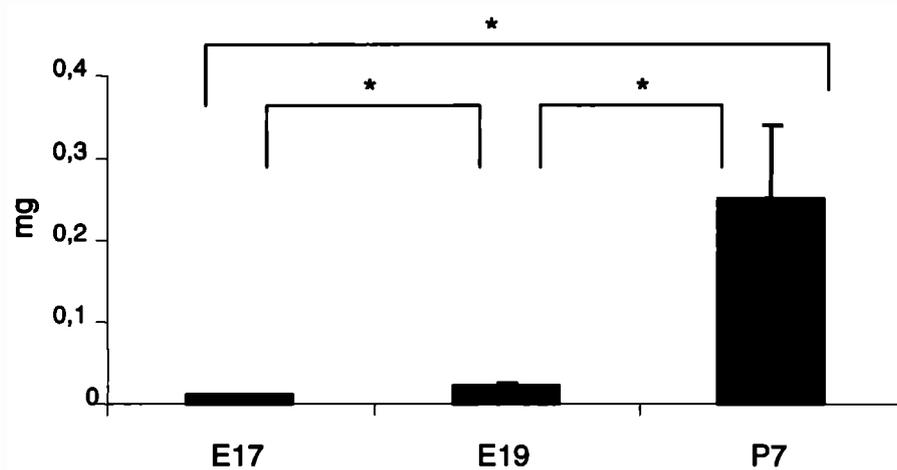


Figura 31: Masa de células CK19 positivas. * $p < 0,05$ $n = 3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

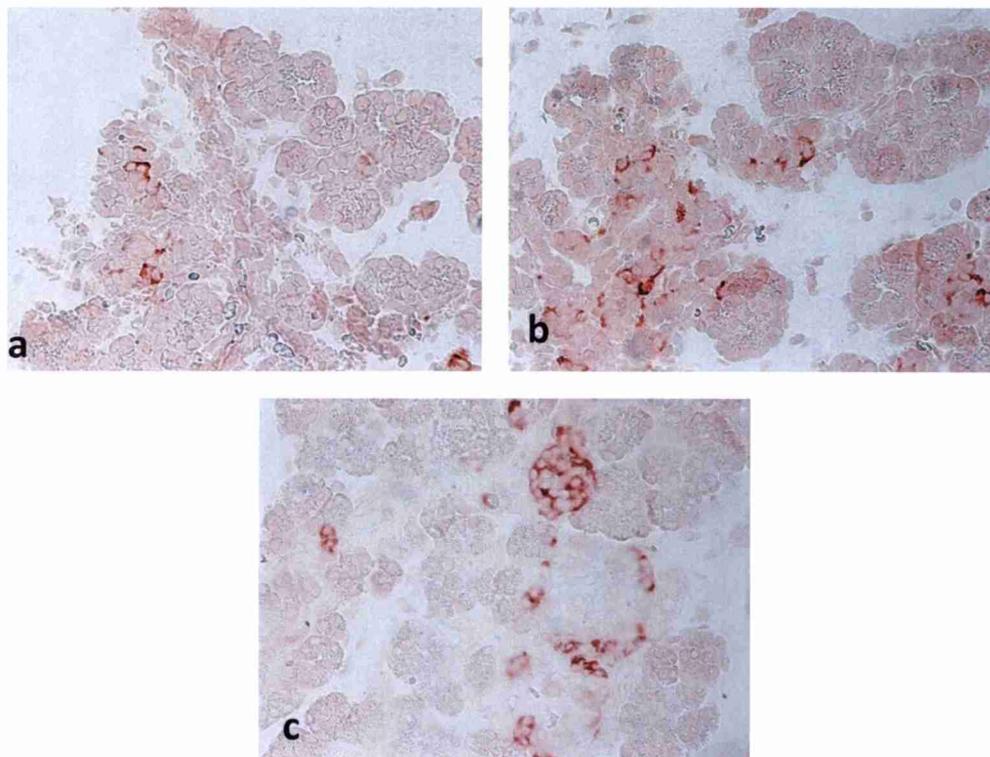


Figura 32: Secciones de páncreas. Inmunomarcación para CK19 (rojo citoplasmático). a-E17(40X), b-E19(40X), c-P7 (40X).

La masa de células INGAP-positivas fue significativamente mayor en P7 respecto de E19 ($p < 0,05$) (Figuras 17 y 33).

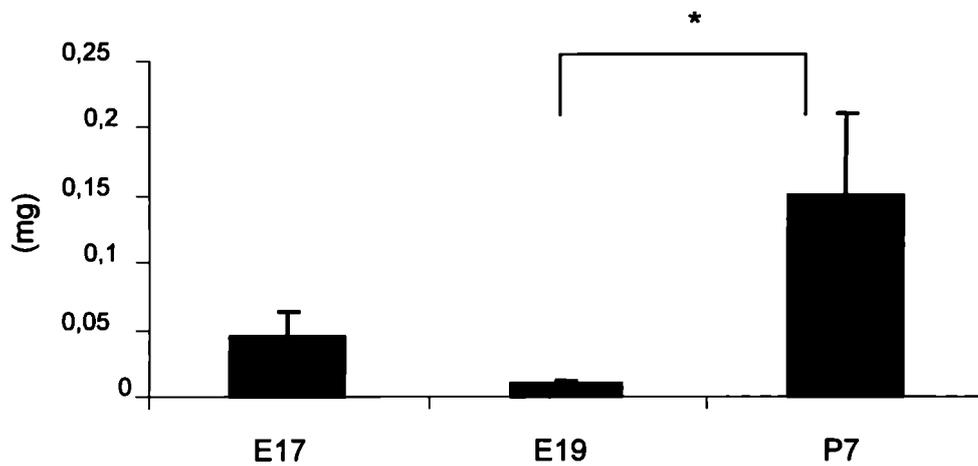


Figura 33: Masa de células INGAP-positivas. * $p < 0,05$ $n = 3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

No se observaron diferencias, en cambio, en el porcentaje de células que co-expresaron PDX-1 e INGAP (Figuras 17 y 34).

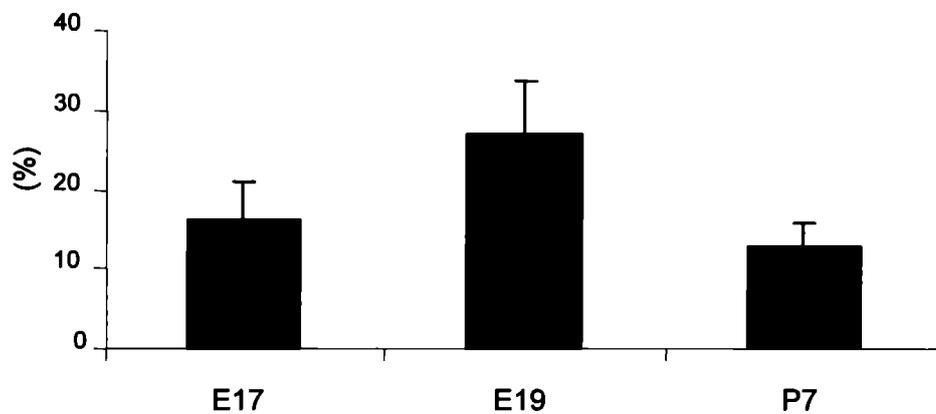


Figura 34: Porcentaje de co-expresión PDX/INGAP $n = 3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM

5.1.5.8 Apoptosis

El porcentaje de células β apoptóticas disminuyó de forma significativa con el avance de la edad (Figuras 35 y 36).

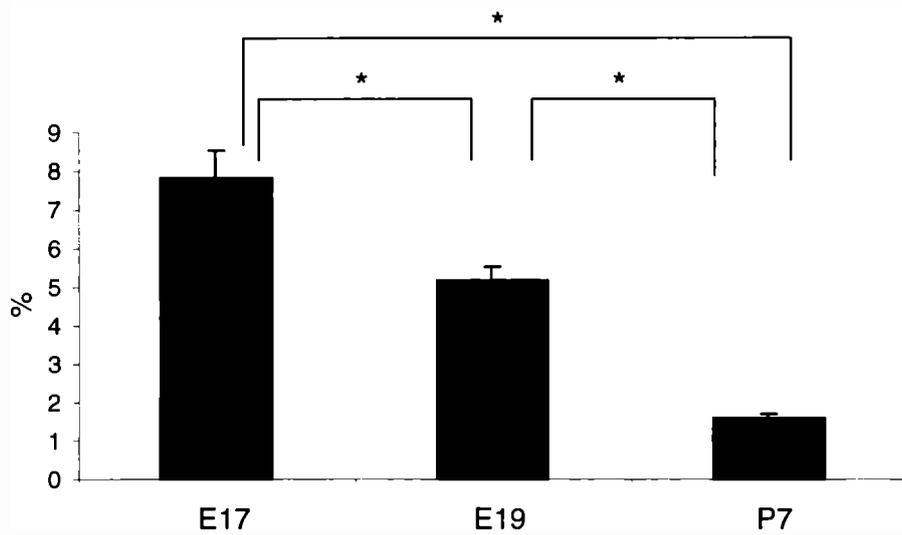


Figura 35: Porcentaje de células β apoptóticas. * $p < 0,05$ $n = 3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

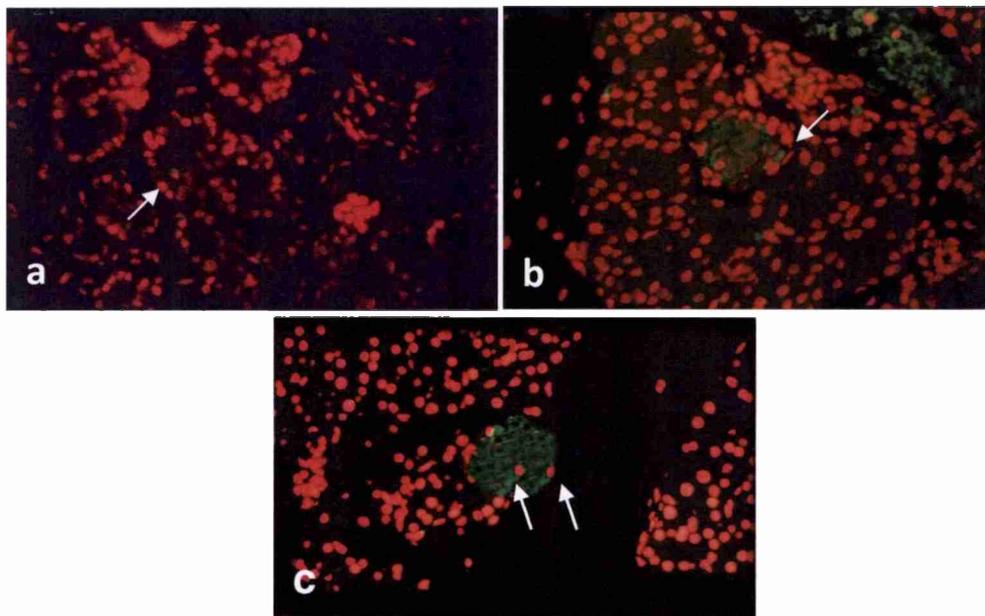


Figura 36: Secciones de páncreas. Autofluorescencia con Ioduro de propidio (rojo nuclear) e inmunofluorescencia para insulina (verde citoplasmático). Las flechas blancas indican células β apoptóticas. Nótese que en a) y b) se muestran células β apoptóticas dispersas ya que en esta edad el embrión no presenta islotes completamente formados. En c) se observa un islote maduro con células β en apoptosis. a-E17, 40 X, b-E19, 40X y c-P7 40X.

5.2 RATAS ADULTAS NORMALES CONTROL Y PREÑADAS

5.2.1 Animales

Se observó un incremento semanal de peso corporal significativo en el grupo M11 respecto de M0 y M28 (M0: $4,64 \pm 0,3$ vs. M11: $8,27 \pm 0,5$ vs. M17: $6,46 \pm 1,8$ vs. M19: $6,15 \pm 1,5$ vs. M28: $4,5 \pm 0,5$ %).

El peso del páncreas no mostró diferencias significativas entre los grupos (Tabla 5). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en la relación del peso del páncreas respecto del peso del animal (Tabla 5).

Tabla 5: Peso del páncreas

Grupo	Peso del páncreas (mg)	% páncreas/peso animal
M0	$633,33 \pm 27,87$	$0,33 \pm 0,01$
M11	$738,17 \pm 36,83$	$0,36 \pm 0,07$
M17	$822,6 \pm 91,06$	$0,38 \pm 0,05$
M19	$542,6 \pm 114,93$	$0,26 \pm 0,06$
M28	$689,3 \pm 98,6$	$0,30 \pm 0,01$

Peso del páncreas y relación peso del páncreas/peso corporal. n=6.
Los valores representan la media \pm EEM.

5.2.2 Consumo diario de agua y alimento sólido

El alimento sólido consumido por todos los grupos contiene 62,8% de hidratos de carbono, lípidos y proteínas y el 37,2% restante está representado por fibras, cenizas, calcio y fósforo. La relación de hidratos de carbono:proteínas:lípidos es 45:43:12, respectivamente.

El grupo M0 consumió una cantidad diaria de alimento significativamente menor respecto de los grupos restantes ($p < 0,05$). Por otro lado, el consumo diario de agua fue significativamente mayor en M19 y M28 respecto de los demás grupos ($p < 0,05$) (Tabla 6).

Tabla 6: Consumo de alimento sólido y agua diarios

Grupo	Comida(g/día)	Agua (ml/día)
M0	11,75 ± 0,49 *	21,05 ± 1,04
M11	16,5 ± 1,75	21,8 ± 1,88
M17	16,77 ± 1,06	26,89 ± 1,11
M19	16,1 ± 0,46	35,91 ± 5,11 a
M28	18,3 ± 0,6	36,7 ± 2,83 b

Comida: * M0 significativamente diferente respecto del resto de los grupos $p \leq 0,05$ M0 y M11 $n=2$; M17 y M19 $n=3$; M28 $n=4$. **Agua:** a M19 vs. M0, M11 y M17 ; b: M28 vs. M0, M11 y M17, $p \leq 0,05$. M0 y M11 $n=3$; M17 y M19 $n=5$; M28 $n=8$. Los valores representan la media ± EEM.

5.2.3 Parámetros séricos

Los grupos M17 y M19 tuvieron glucemias significativamente menores respecto de M0, M11 y M28 ($p < 0,05$). Concurrentemente, los valores de insulinemia fueron estadísticamente mayores en M11 respecto de M0, M19 y M28 ($p < 0,05$). Los índices HOMA- β y HOMA-IR fueron significativamente mayores en M11 respecto al resto de los grupos ($p < 0,05$) (Tabla 7).

Tabla 7: Glucosa e insulina plasmáticas e índices HOMA- β y HOMA-IR

GRUPO	Glucemia (mg/dl)	Insulinemia (ng/ml)	HOMA β	HOMA IR
M0	157,5 ± 3,4	0,85 ± 0,09	73,3 ± 8,4	5,6 ± 0,25
M11	161,8 ± 15,2	1,63 ± 0,18 a	99,7 ± 5,1 a	20,8 ± 2,3 a
M17	117,2 ± 6,7 a	1,17 ± 0,21	68,7 ± 5,6	6,0 ± 1,06
M19	107,7 ± 5,2 b	0,94 ± 0,12	77,12 ± 5,84	5,1 ± 0,4
M28	149,4 ± 7.2	0,77 ± 0,07	50,2 ± 3,9 b	6,2 ± 0,06

Glucemia: a: M17 vs. M0, M11 y M28, b: M19 vs. M0, M11 y M28. $p < 0,05$

Insulinemia aM11 > respecto de M0, M19 y M28. $p < 0,05$.

Homa- β : aM11 > .respecto del resto de los grupos; b M28 vs. M0, M11, M17 y M19 $p < 0,05$

HOMA-IR: aM11 > respecto al resto de los grupos. $p < 0,05$.

$n=6$ en cada grupo. Los valores representan la media ± EEM

5.2.4 Contenido de insulina pancreática y secreción de insulina *in vitro*

El contenido de insulina pancreática fue significativamente menor en M0 respecto de los grupos restantes, mientras que en M19 fue mayor cuando se lo comparó con M0, M11 y M28, mostrando valores similares a los de M17 (M0: $0,33 \pm 0,03$ vs. M11: $0,54 \pm 0,06$ vs. M17: $0,7 \pm 0,07$ vs. M19: $0,72 \pm 0,03$ vs. M28: $0,55 \pm 0,05$, ng/mg páncreas; $p < 0,05$; $n = 15$).

La secreción de insulina de islotes aislados en respuesta a glucosa 16,6 mM fue significativamente mayor respecto de 3,3 mM glucosa en todos los grupos ($p < 0,05$) (Figura 37).

Comparando los diferentes grupos entre sí, la secreción de insulina fue menor en M11 (frente a 3,3mM de glucosa y 16,6 mM de glucosa), mientras que M28 secretó mayor cantidad de insulina frente a ambos estímulos ($p < 0,05$) (Figura 37).

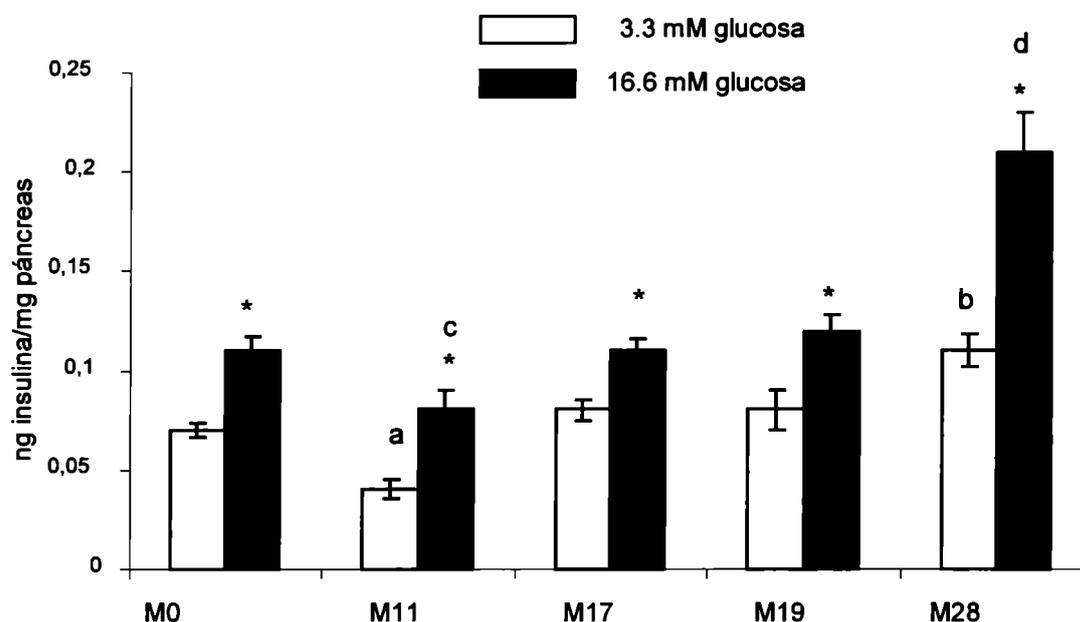


Figura 37: Secreción de insulina "*in vitro*" glucosa 3,3mM y 16,6mM.

* significativo respecto de su control a glucosa 3,3mM.

a M11 vs. el resto de los grupos en glucosa 3,3mM; $p < 0,05$

b M28 vs. el resto de los grupos en glucosa 3,3mM; $p < 0,05$

c M11 vs. el resto de los grupos en glucosa 16,6mM; $p < 0,05$

d M28 vs. el resto de los grupos en glucosa 16,6mM; $p < 0,05$

$n = 15$ en cada grupo. Los valores representan la media \pm EEM.

5.2.5 Datos morfométricos

5.2.5.1 Morfometría insular

El tamaño de los islotes del grupo M0 fue significativamente menor que el registrado en los grupos M17 y M19 ($p < 0,05$) (Figuras 38 y 43).

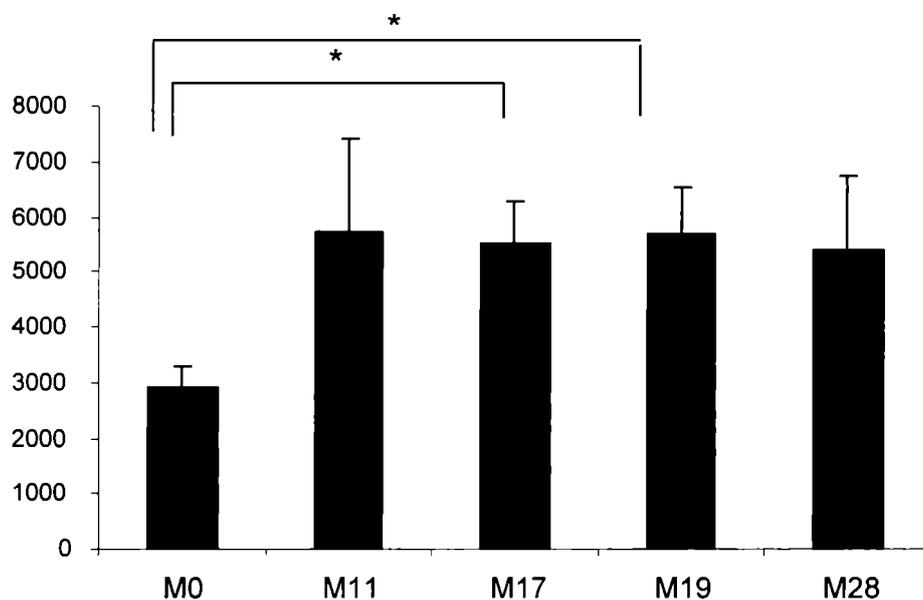


Figura 38: Tamaño insular; * $p < 0,05$; $n=3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

El número de islotes por unidad de área fue significativamente mayor en M19 respecto de M0, M11, M17 y M28 ($p < 0,05$) (Figura 39).

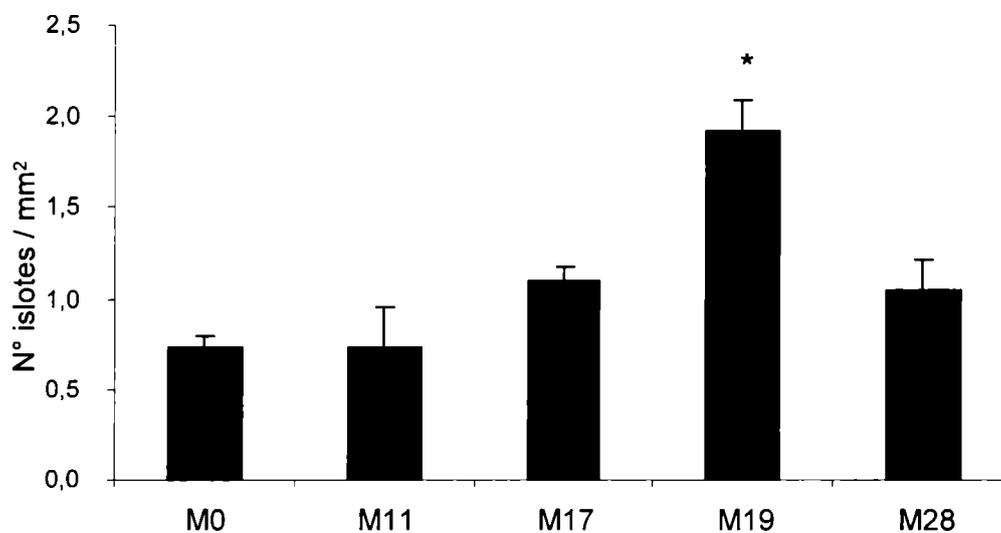


Figura 39: Número de islotes por unidad de área (mm^2); * $p < 0,05$ respecto de los grupos restantes; $n=3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM

Sin embargo, el tamaño de las células β no fue diferente entre los grupos (Figura 40).

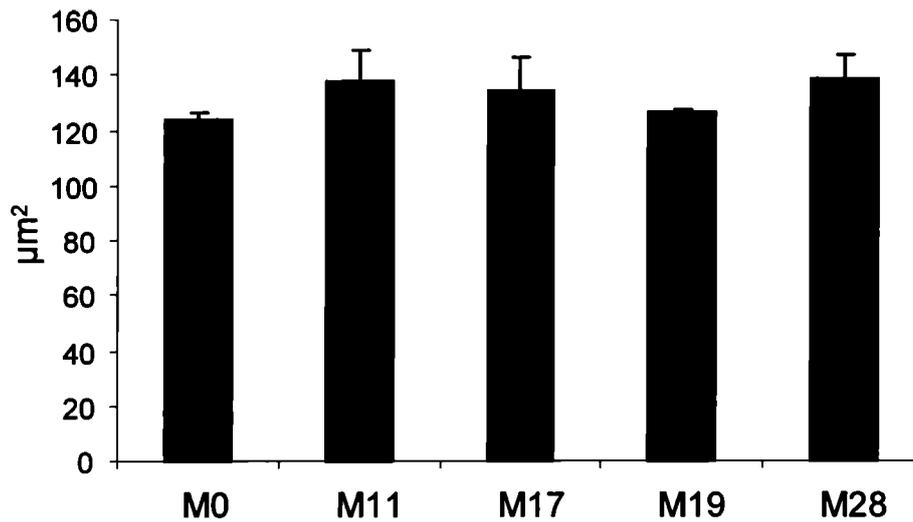


Figura 40: Tamaño de las células β ; n=3 animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

El número de células β por islote fue menor en M0 respecto de los grupos restantes, siendo significativamente menor respecto de M17, M19 y M28 ($p < 0,05$) (Figuras 41 y 43).

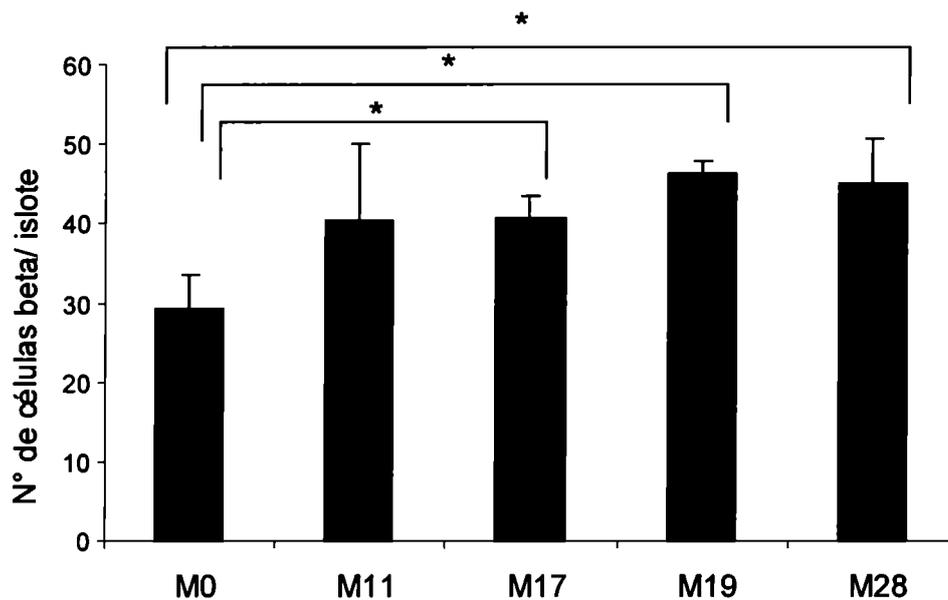


Figura 41: Número de células β por islote. * $p < 0,05$; n=3 animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

Estos resultados sugieren que el aumento del tamaño de los islotes observado a partir del día 17 de preñez es el resultado de una hiperplasia y no de una hipertrofia de las células β .

5.2.5.2 Masa de células insulares y células β extrainsulares

La masa de células β insulares fue significativamente menor en M0 respecto del resto de los grupos ($p < 0,05$) (Figura 42).

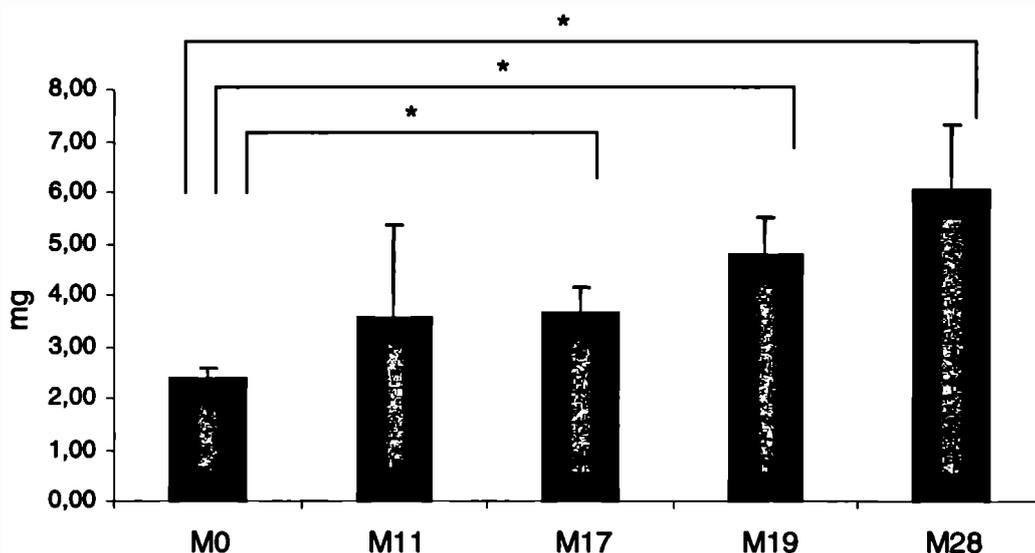


Figura 42: Masa de células β insulares. * $p < 0,05$ $n=3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

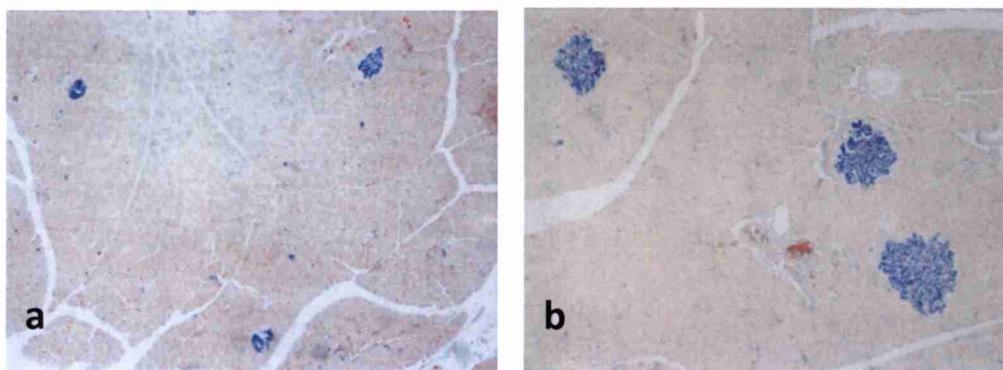


Figura 43: Secciones de páncreas. Inmunocoloración con insulina (azul citoplasmático). Obsérvese el mayor tamaño de los islotes en b) lo que da una mayor masa de células β . a-M0(10X), b-M19 (10X).

La masa de células β extrainsulares aumentó significativamente en M28 respecto del grupo control M0 y del grupo M11. El valor mayor se registró en M19, resultando significativo respecto de M0 ($p < 0,05$) (Figura 44).

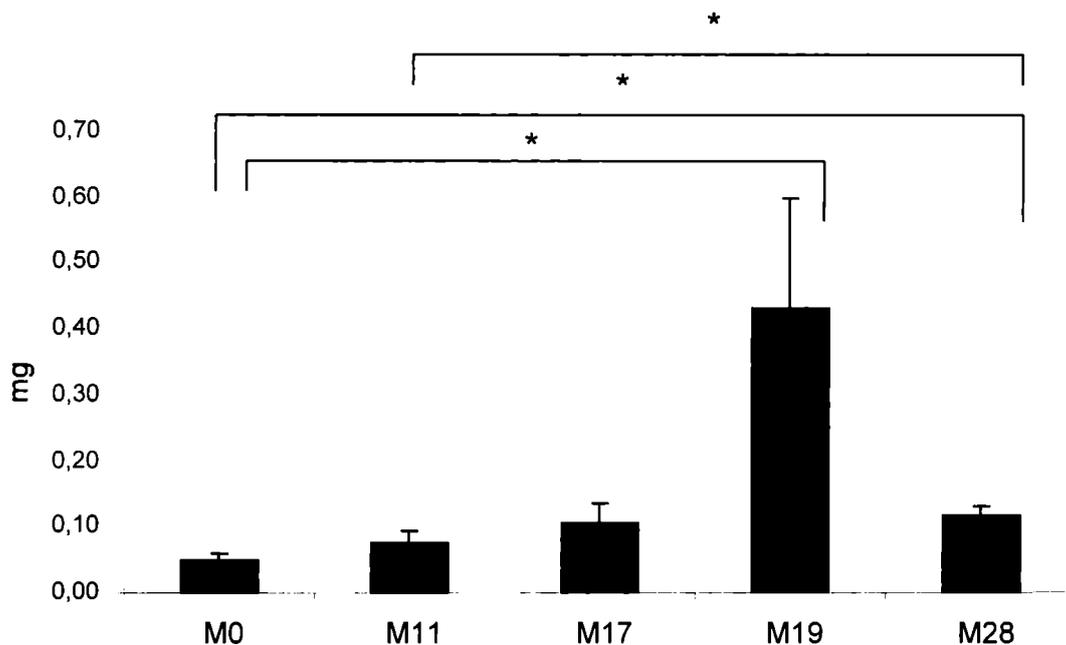


Figura 44: Masa de células β extrainsulares; * $p < 0,05$ $n = 3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

La masa de células β total (insulares y extrainsulares) se vio incrementada significativamente en M17, M19 y M28 respecto del grupo control M0 ($p < 0,05$) (Figura 45). En las ratas preñadas, la masa total de células β aumentó significativamente en función de la progresión de la gestación y se mantuvo durante el inicio de la lactancia (M28) (Figuras 43 y 45).

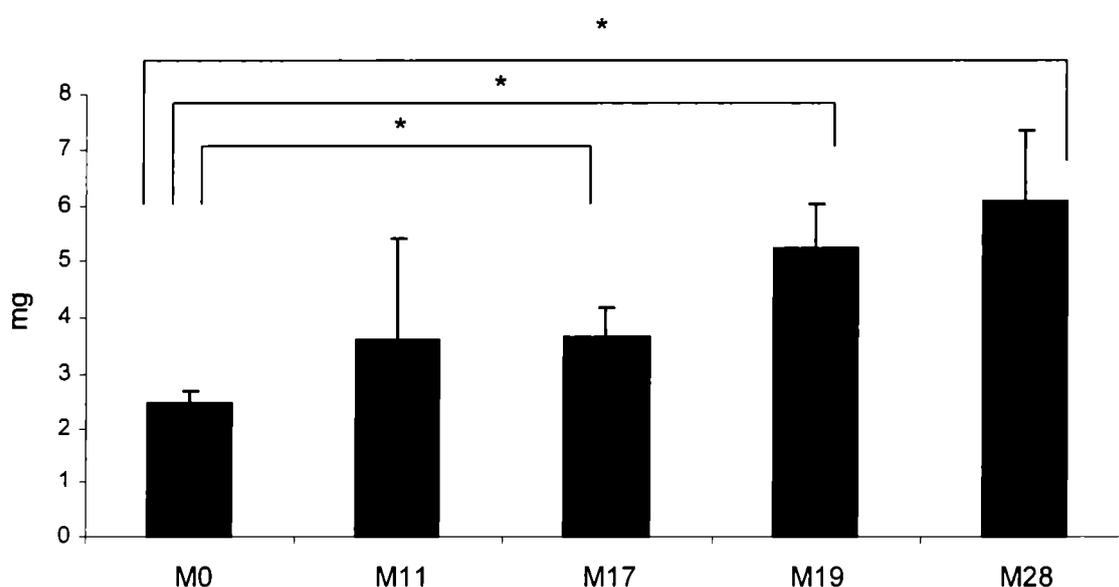


Figura 45: Masa de células β total; * $p < 0,05$ $n = 3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

La masa de células no β fue significativamente menor en M17 respecto de M0, M19 y M28, alcanzando su valor mayor en el grupo M28 ($p < 0,05$); (Figuras 46 y 47).

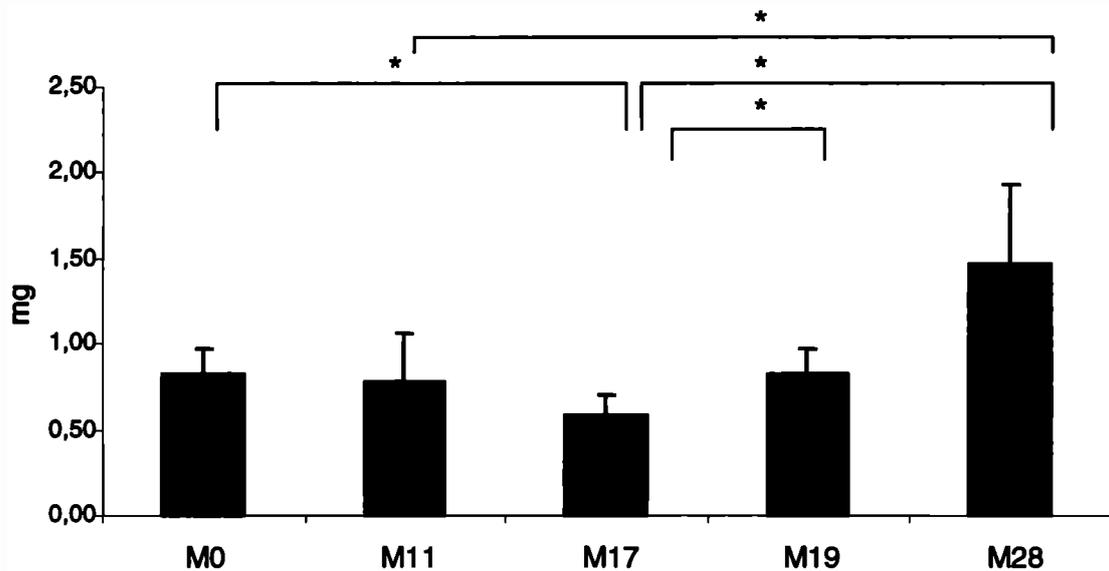


Figura 46: Masa de células no β . * $p < 0,05$ n=3 animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

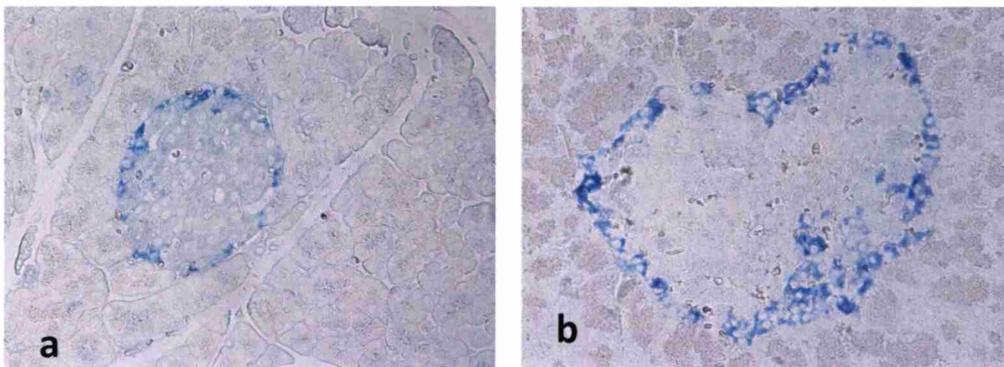


Figura 47: Secciones de páncreas. Inmunorreacción para células no- β en azul citoplasmático (glucagón, polipéptido pancreático, somatostatina). Obsérvese la menor cantidad de área inmunomarcada en a-M17 (40X) vs. b-M19 (40X).

5.2.5.3 Replicación de células β

La tasa de replicación de células β alcanzó su valor máximo en M17 (significativamente diferente respecto a los grupos M0, M11, M19 y M28; $p < 0,05$) Posteriormente disminuyó progresivamente y alcanzó su valor mínimo en el grupo M28 (significativamente diferente de M11, M17 y M19; $p < 0,05$) (Figuras 48 y 49).

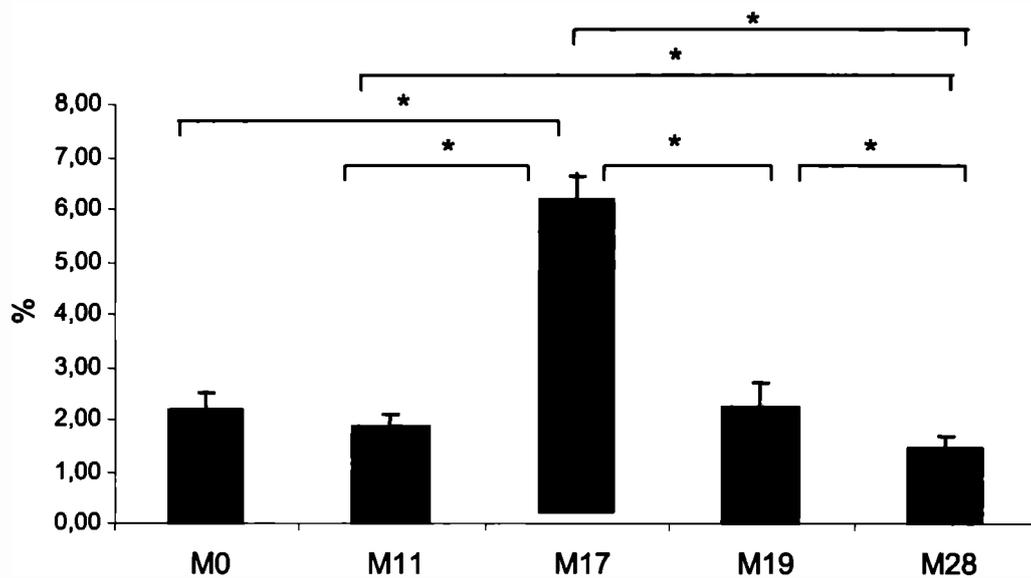


Figura 48: Tasa de replicación de células β . * $p < 0,05$ $n = 3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

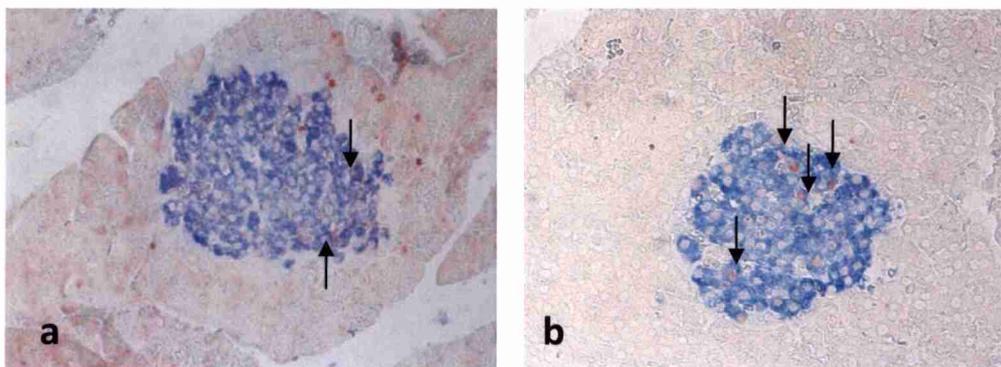


Figura 49: Secciones de páncreas. Inmunocoloración para PCNA (rojo nuclear) e insulina (azul citoplasmático). Nótese el mayor número de células β coloreadas con PCNA en b) a-M0 (40X), b-M17(40X).

5.2.5.4 Marcadores de diferenciación endócrina

La masa de células PDX-1 positivas aumentó significativamente en M19 respecto de M0 y el resto de los estadios verificados ($p < 0,05$) (Figuras 50 y 56).

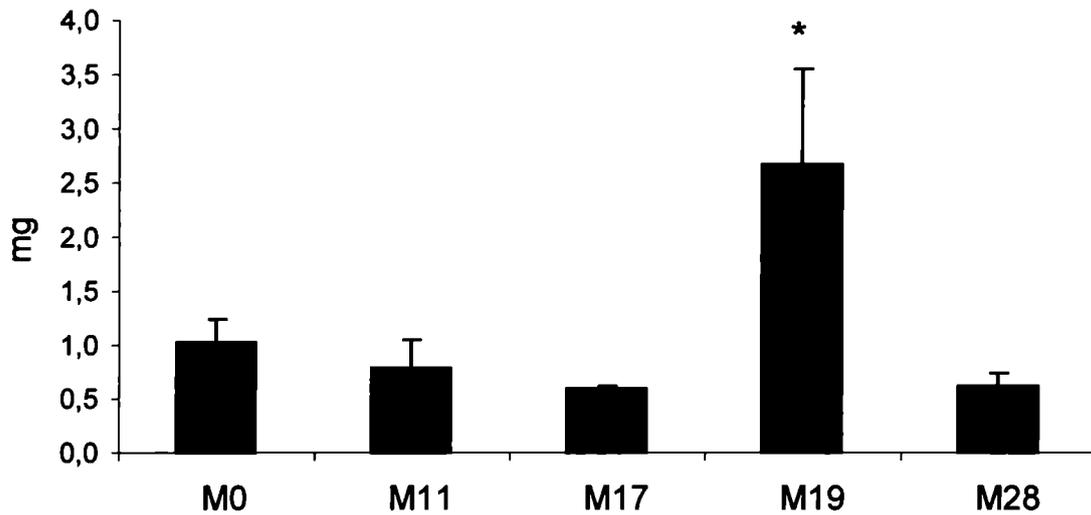


Figura 50: Masa de células PDX-1-positivas por unidad de área (mm^2).
 * $p < 0,05$ respecto de los grupos restantes; $n=3$ animales, 3 niveles diferentes.
 Los valores representan la media \pm EEM

El número de células NKX6.1 positivas mostró un aumento gradual y significativo durante la preñez, volviendo al valor del control (ratas no preñadas) en M28 ($p < 0,05$) (Figuras 51 y 52).

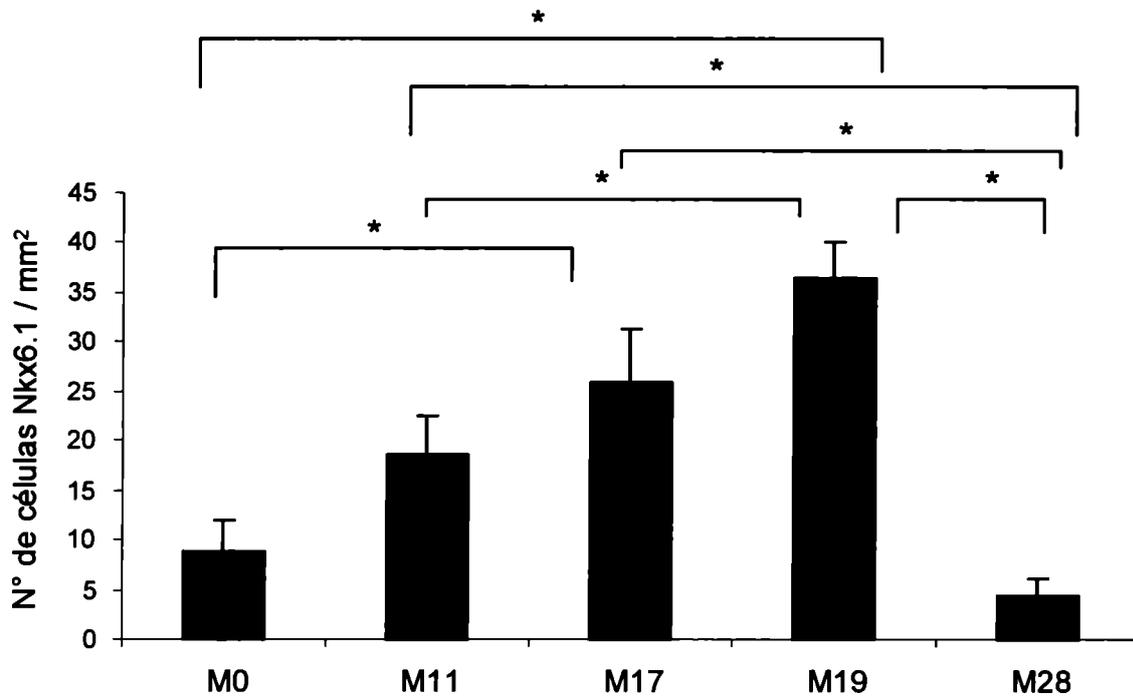


Figura 51: Número de células NKX6.1 positivas por unidad de área (mm^2).
 * $p < 0,05$; $n=3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM

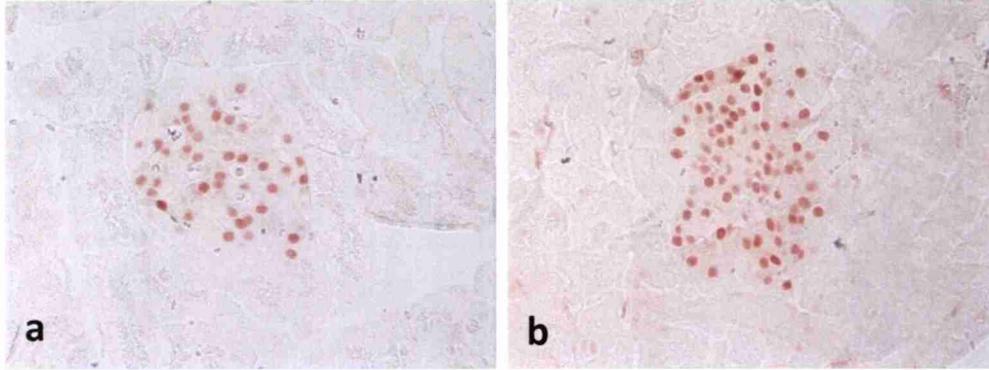


Figura 52: Secciones de páncreas. Inmunocoloración con NKX6.1 (rojo nuclear). a-M0 (40X), b-M19 (40X).

5.2.5.5 Marcadores de neogénesis insular

La masa de células CK19 positivas sólo mostró un cambio significativo (disminución) en M11 respecto a M0, sin experimentar cambios significativos en el resto de los estadios ($p < 0,05$) (Figuras 53 y 54).

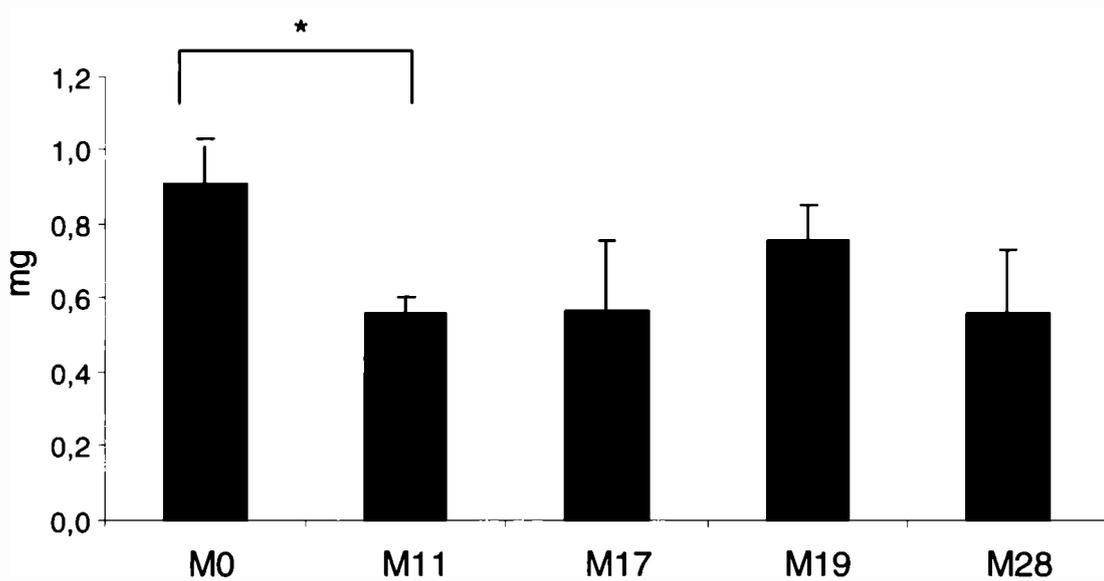


Figura 53: Masa de células CK19 positivas; * $p < 0,05$; $n = 3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

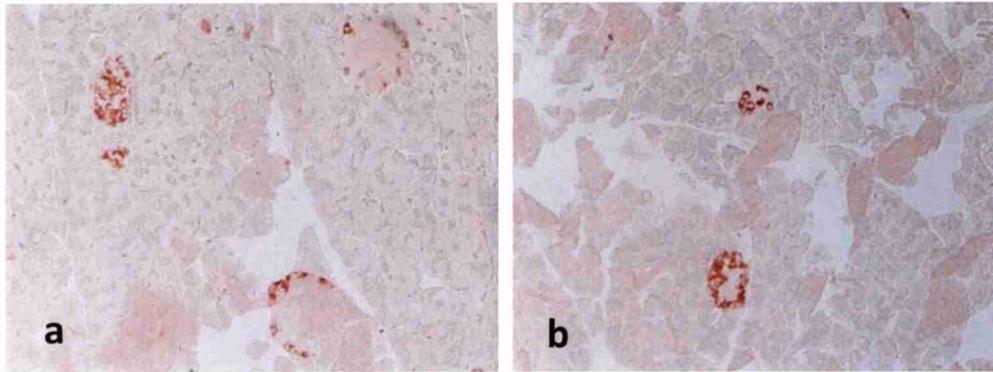


Figura 54: Secciones de páncreas. Inmunotinción con CK19 (rojo citoplasmático). a-M0 (20X), b- M11 (20X).

La masa de células INGAP-positivas fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en M19 respecto del resto de los grupos estudiados, excepto M28 (Figuras 55 y 56).

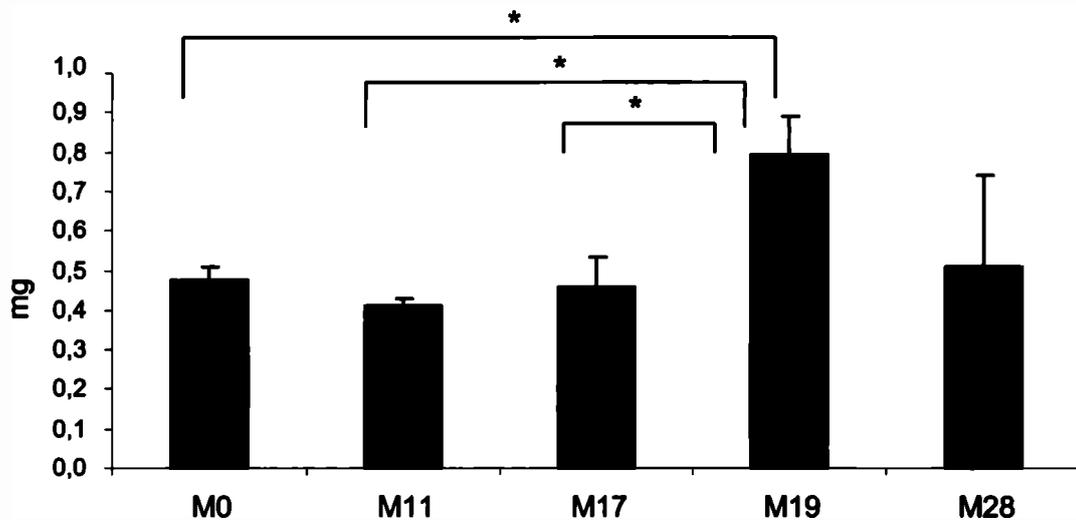


Figura 55: Masa de células INGAP positivas; * $p < 0,05$; $n = 3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

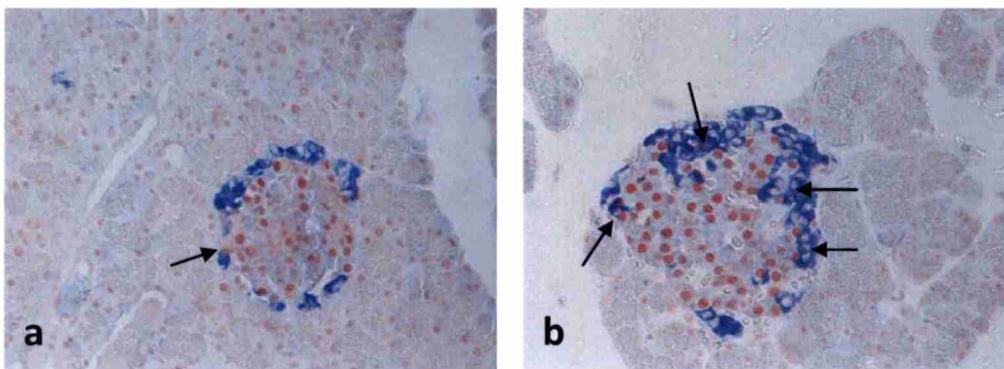


Figura 56: Secciones de páncreas. Inmunocoloración con PDX-1 (rojo nuclear) e INGAP (azul citoplasmático). Se puede observar el incremento del INGAP y PDX-1 en b). Las flechas permiten apreciar el mayor número de células que coexpresan PDX-1/INGAP en b). a-M0 (40X), b-M19 (40X).

También se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) del porcentaje de células que co-expresaron PDX-1 e INGAP en M17 y M19 respecto a M0 y retornando a valores no diferentes del control en M28 (Figuras 56 y 57).

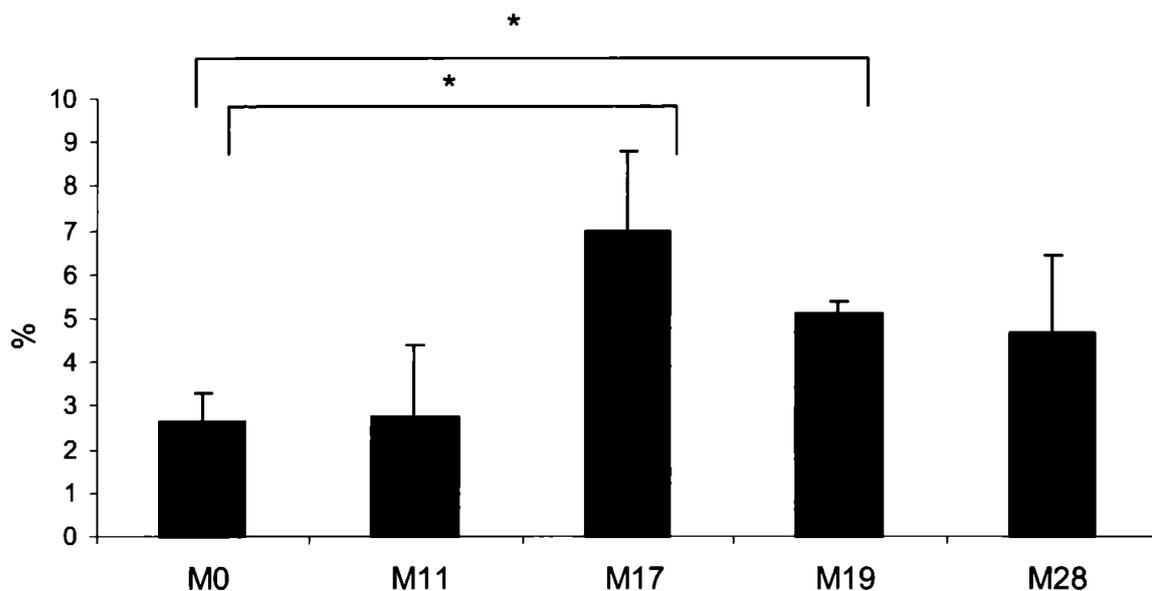


Figura 57: Porcentaje de co-expresión PDX/INGAP; * $p < 0,05$; $n=3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

5.2.5.6 Apoptosis

El porcentaje de células β apoptóticas disminuyó significativamente con el avance de la gestación ($p < 0,05$) a partir de los 11 días de preñez y hasta los 19 días de gestación (Figuras 58 y 59).

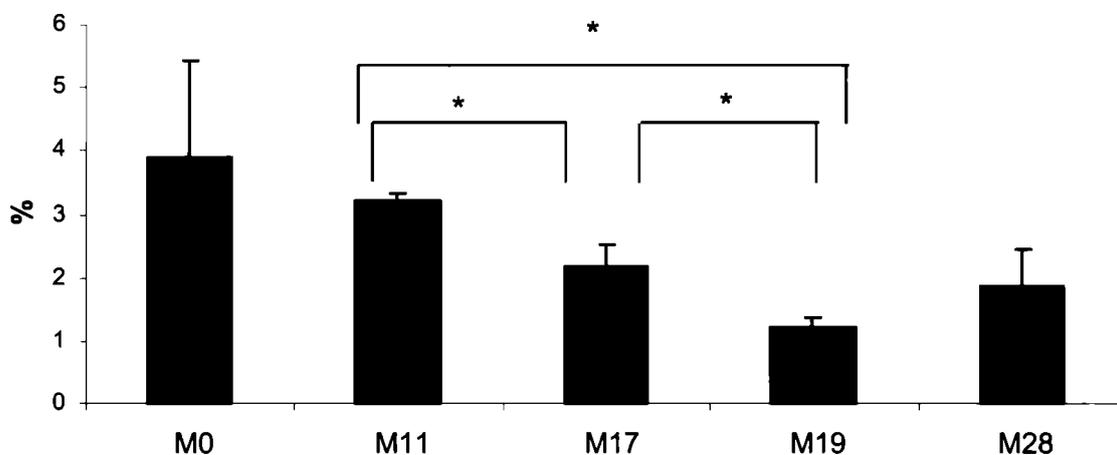


Figura 58: Porcentaje de células β apoptóticas. * $p < 0,05$ $n=3$ animales, 3 niveles diferentes. Los valores representan la media \pm EEM.

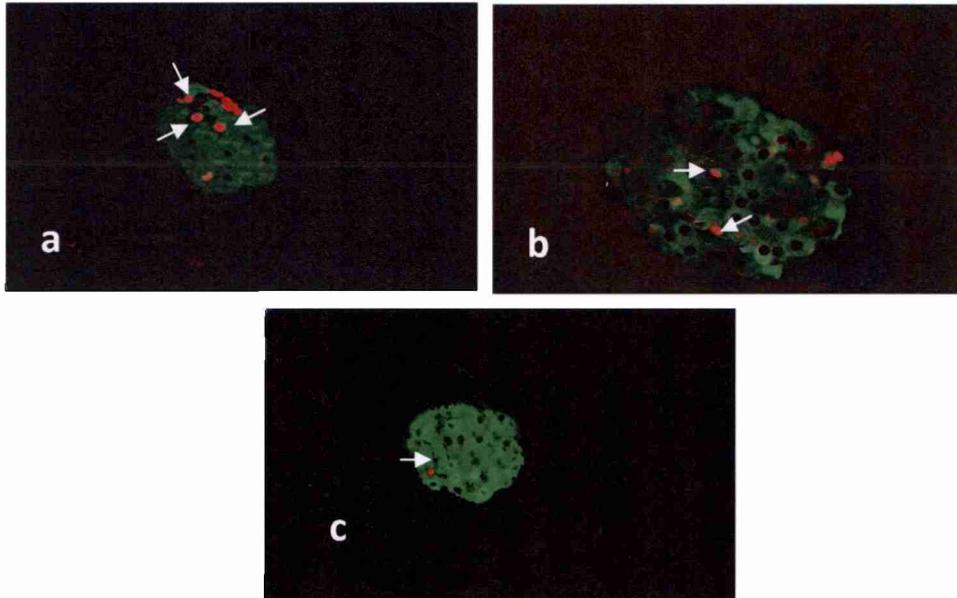


Figura 59: Secciones de páncreas. Autofluorescencia con Ioduro de propidio (rojo nuclear) e insulina (verde citoplasmático). Las flechas muestran células β apoptóticas a-M11 (40X), b-M17 (40X), c-M19 (40X).

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

Para facilitar el análisis y discusión de los datos registrados, describiremos separadamente la información correspondiente a fetos y recién nacidos y la de las madres.

6.1 Fetos y Recién Nacidos

6.1.1 Experimentos "in vivo": El peso de los fetos y de sus páncreas, al igual que el de las crías de una semana (P7), mostró un incremento acorde con el avance de la gestación y edad post nacimiento. La relación peso del animal/peso del páncreas se mantuvo constante (alrededor del 0.2%) en todas las edades registradas. Otros autores que han estudiado los mismos parámetros a los 15, 18 y 20 días de preñez y a los 2 y 7 días postparto, encontraron un incremento en el peso del páncreas sólo a los 7 días post-nacimiento (Svensson AM y col., 2004).

A nivel sérico, las glucemias fueron significativamente menores en los fetos (E17 y E19) respecto a las registradas en las crías de una semana (P7). Estos datos coinciden con la observación directa de la presencia de leche en el estómago de las crías de una semana postparto al momento de su sacrificio.

El contenido pancreático de insulina, en cambio, se mantuvo dentro del mismo rango en todos los estadios registrados. Dado que, como veremos posteriormente, los páncreas fetales no responden a la glucosa, las diferencias observadas en las glucemias no estarían relacionadas con el contenido pancreático y la liberación de insulina fetal.

La arquitectura del islote adulto normal, con las células β (proporción mayoritaria de células insulares) ubicadas centralmente, se observó recién a los siete días posteriores al nacimiento (P7). Estos resultados concuerdan con los de otros autores que describen hallazgos similares en el ratón al final de la gestación (Edlund H, 2001a).

Al igual que lo descrito por otros autores, la masa β total (fracción insular más extrainsular) aumentó progresiva y significativamente en el intervalo E17 y P7. Esta curva ascendente de la masa celular β en función del tiempo se acompañó de a) un aumento paralelo, aunque no significativo, del tamaño de los islotes, b) un incremento marcado del número de células β insulares sin cambios significativos en su tamaño, c) un aumento de masa de citoqueratina, d) un aumento del número de células PDX-1-positivas, y e) una disminución significativa de la tasa de apoptosis de células β . En

conjunto, estos datos muestran que el aumento de la masa de células β registrado es debido al aumento de su número consecutivo al incremento de su replicación, de su neogénesis y a la disminución de su apoptosis. Estos resultados confirman los descritos previamente por otros autores (Bouwens L y col., 1994; Kaung HL, 1994; Mc Kinnon CM & Docherty K, 2001; Sharma A y col., 1999) y dan validez a nuestro modelo.

La evolución inversa observada en el número de células NGN-3-positivas sugiere la existencia de una retroalimentación negativa entre NGN-3 y masa celular β .

La evolución inversa (disminución) de masa de células no β con el progreso de la preñez respecto a la masa celular β es consistente con la cronología de aparición de las células insulares (Pictet R & Rutter WJ, 1972; Gomez Dumm CLA y col., 1987).

El cambio verificado en la masa de células INGAP-positivas, uno de los objetivos de estudio de esta tesis, mostró una tendencia comparable a la de la masa de células β , alcanzando valores máximos en las crías de 7 días (P7). No registramos la presencia de células INGAP-positivas en el grupo E11 cuando las células endocrinas aún no se han diferenciado. La diferenciación de células endocrinas, particularmente de células β , se produce en el ratón a partir del día 13-15,5 de gestación, a expensas de precursores indiferenciados; a esta etapa se la denomina transición secundaria (Pictet R & Rutter WJ, 1972; Jensen J y col., 2000). Como en la rata estos cambios ocurren dos días más tarde, las células INGAP-positivas recién aparecerían durante este estadio, aumentan su masa en función de la edad de gestación y logran valores máximos en el recién nacido.

Por otra parte, el porcentaje de células que co-expresan Pdx-1/INGAP mostró una tendencia opuesta, pero los cambios no fueron significativos. El hecho demostrado previamente (Gagliardino JJ y col., 2003; Madrid V y col., 2009) de que estas células serían precursores tempranos de células β y que durante el desarrollo fetal muestran una evolución diferente a la de las células INGAP-positivas, sugiere que ambos tipos celulares cumplen funciones diferentes en el control de la masa de células β durante el desarrollo intrauterino.

Cuando hablamos de células INGAP-positivas, ¿estamos midiendo realmente esa proteína? Nuestros datos proveen evidencia para responder este interrogante.

Como se mencionó en la Introducción, el Ingap fue aislado inicialmente del páncreas de hámster y posteriormente clonado (Rafaeloff R y col., 1997); en cambio en la rata su presencia en el páncreas sólo ha sido identificada por técnicas inmunocitoquímicas

(Del Zotto H y col., 2004), y la secuencia nucleotídica del gen de INGAP no ha sido aún identificada. Actualmente se acepta que el INGAP pertenece a una familia de proteínas que aparecen en respuesta al daño y disminución de la masa de células β : las proteínas REG (Castellarin ML y col., 2007). Esta aseveración se basa en la comparación entre las secuencias de los genes que codifican las diferentes proteínas de la familia REG en distintas especies con la del INGAP de hámster.

Las proteínas REG fueron descritas inicialmente por el grupo de Okamoto en páncreas de animales con diabetes inducida por estreptozotocina (Terazono K y col., 1988; Miyaura C y col., 1991; Abe M y col., 2000). Al analizar la secuencia del ADNc de INGAP de hamster y verificar en el banco de genes cuáles eran los ADNc de rata con mayor homología (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), encontramos que el ADNc de REG3 β presentaba la más alta homología (71%). La secuenciación del fragmento de PCR amplificado de 107 bases obtenido en este estudio con los cebadores degenerados DegR-I demostró 100 coincidencias (93.5%) con la región de Reg3 β tomada como base para diseñar los cebadores. Las 68 coincidencias (64%) de este fragmento con la secuencia de INGAP de hamster corresponden a bases que también coinciden con la de Reg3 β . Por otro lado, la secuenciación del fragmento amplificado con los cebadores Reg3 β utilizando como molde ADNc de hámster mostró 97% de coincidencias. Por otra parte, se ha demostrado que un pentadecapéptido del INGAP que contiene la secuencia de sus aminoácidos 104-119, reproduce los efectos biológicos de la molécula intacta tanto *in vivo* como *in vitro* (Rosenberg L y col., 2004; Madrid V y col., 2009). Este péptido de 15 aminoácidos muestra una estabilidad en solución que no presentan análogos de igual composición de aminoácidos pero con cambios en su secuencia (McCarthy AN y col., 2009) y su análogo tirosilado se liga específicamente a tejidos blanco del INGAP (Borelli MI y col., 2007). La secuencia de aminoácidos de este pentadecapéptido presenta una homología del 80% con la de la proteína Reg3 β .

Otro hecho sugerente en nuestro estudio respecto a la relación INGAP- Reg3 β es que el pico de expresión de este último precede (E19) al incremento de INGAP inmunodetectable (P7). Finalmente, el anticuerpo utilizado para la detección inmunocitoquímica del INGAP reconoce un epítipo de 20 aminoácidos, cuya homología con el Reg3 β es del 60%. Aunque los anticuerpos reconocen la estructura tridimensional del epítipo y los aminoácidos de la proteína blanco involucrados en la interacción antígeno-anticuerpo no necesariamente deben ser contiguos, es llamativo que de los 20 aminoácidos del epítipo, los primeros 13 presentan una homología del 85% con la secuencia de REG3 β .

En conjunto, estos resultados: 1) refuerzan el concepto de que el INGAP pertenece a la familia REG, 2) sugieren fuertemente que la reacción inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-INGAP utilizaría en la rata al REG3 β , y 3) sugieren además que en el hámster coexistirían el REG3 β y el INGAP, mientras que en la rata estaría solamente el REG3 β .

6.1.2 Experimentos “*in vitro*”: Los páncreas obtenidos a los 17 días de gestación e incubados con diferentes estímulos no aumentaron la secreción de insulina en respuesta a la glucosa 16,6 mM (respecto de glucosa 3,3 mM), pero sí lo hicieron en respuesta a la arginina. Esta diferente respuesta a la glucosa y a la arginina se repitió a los 19 días, pero con valores absolutos más elevados. Los páncreas de P7 en cambio, aumentaron la secreción de insulina tanto en respuesta a la glucosa 16,6 mM como frente al estímulo de arginina. Los valores de insulina medidos fueron significativamente mayores que los registrados en E17 y E19 y la respuesta a la glucosa alta fue de magnitud similar a la de la arginina. Resultados similares fueron descritos por otros autores (Asplund KS y col., 1969 y 1970; Edlund H, 2001a; Borelli MI y col., 2005), quienes utilizando islotes aislados de neonatos de una semana de edad también demostraron un aumento de la secreción de insulina *in vitro* frente al estímulo de glucosa 16,6 mM respecto del basal.

Dado que el contenido de insulina pancreática en E17 y E19 no fue significativamente diferente del correspondiente a P7, la variación en las respuestas secretoras no estaría condicionada por la disponibilidad de la hormona. En este sentido, se ha descrito que el páncreas fetal no reconoce el estímulo de glucosa porque la glucoquinasa, enzima clave para su metabolización, no es funcionalmente activa en ellos mientras que sí lo es en los animales de 7 días de edad (Weinhaus A y col., 2007; Taniguchi S y col., 2000). La arginina en cambio, es débilmente metabolizada en la célula β , pero al ser transportada al interior celular cargada positivamente, despolarizaría su membrana plasmática (Cherif H y col., 2001). Esto activa los canales de Ca⁺² dependientes de voltaje, aumenta la entrada y concentración de Ca⁺² citosólico y promueve de esta manera la exocitosis de insulina.

La mayor respuesta de los recién nacidos frente a concentraciones elevadas de glucosa podría relacionarse con el efecto de las incretinas (GLP-1 y GIP), como se describiera en recién nacidos de 7,7 días (Padidela R y col., 2009). En efecto, las incretinas tienen como función primordial a nivel insular, regular el umbral de sensibilidad de las células β a la glucosa (Holst JJ, 2007; Aaboe K y col., 2008; Holst, JJ y col, 2008) aumentando la secreción de insulina y la masa celular β en este

período postnatal (Soltani N y col., 2007; Buteau J, 2008). Estos datos coinciden con el incremento de la masa β observada en este estudio a los 7 días postparto.

El INGAP también estaría involucrado en el cambio registrado en la secreción de insulina en respuesta a secretagogos. Cabe considerar que en esta etapa de maduración de la función de las células β , el aumento progresivo (en función de la edad) de la cantidad de insulina segregada y el reconocimiento de la concentración de glucosa coinciden con el aumento de la masa de células INGAP-positivas. La demostración del efecto modulador del INGAP sobre la secreción de insulina demostrado tanto *in vitro* (Borelli MI y col., 2005; Barbosa H y col., 2006) como *in vivo* (Madrid V y col., 2009) sugieren que los cambios en la función secretora de las células β estaría condicionado, al menos en parte, por el aumento paralelo ocurrido en la masa de células INGAP-positivas.

6.2 Ratas adultas normales control y preñadas

6.2.1 Experimentos “*in vivo*”: las ratas preñadas mostraron un incremento de peso en el día 11, manteniéndose sin cambios significativos respecto al control (ratas no preñadas) en el resto de los tiempos registrados. El peso de los páncreas no mostró cambios significativos en ninguno de los estadios verificados.

Las glucemias registradas demostraron un descenso significativo de sus valores en M17 y M19 que está de acuerdo con lo descrito en la literatura (Picon I & Montane M, 1968; Mornagi B y col., 2004). El mantenimiento de la glucemia en el grupo M11 respecto del control no preñado coincidió con un incremento significativo de los valores de insulinemia, HOMA-IR y HOMA β . En conjunto, estos cambios apoyan el concepto de que durante la preñez hay una disminución de la sensibilidad de los tejidos a la insulina (aumento HOMA IR) que es compensado con un aumento de la secreción de insulina y de la capacidad funcional de las células β (Cacho J y col., 2008). En función de los datos correspondientes a masa de células β medida en M11, el cambio del HOMA β ocurrido en este estadio obedecería más a un aumento de la función que de la masa de las células β .

La masa total de células β (insular y extrainsular) mostró un aumento progresivo y significativo en función de la edad gestacional y se mantuvo durante el primer tercio de la lactancia (M28). Este aumento estuvo asociado con un aumento del número de células β . En función de los datos registrados, este aumento sería consecuencia de una marcada disminución de la tasa de apoptosis de células β y en menor proporción de un aumento transitorio (M17) de la tasa de replicación. Nuestro grupo describió

cambios similares respecto al papel de la apoptosis como regulador de los cambios en la masa de células β en la rata adulta (Lombardo YB y col., 1996), con escasa o nula participación de la neogénesis (Del Zotto H y col., 2004), que refuerzan esta interpretación.

Estudios previos han demostrado que el aumento de la masa de células β registrado durante la preñez es un mecanismo compensador de la mayor demanda de insulina (insulinorresistencia) generada por las hormonas placentarias (Brelje TC y col., 1993, 2004, (Sorenson RL & Brelje TC 1997, 2001). El aumento simultáneo y significativo de la masa de células INGAP-positivas registrado en el día 19 de gestación (M19) en este estudio, sugiere que el INGAP formaría parte del mecanismo productor del incremento de la masa de células β . Apoya esta presunción el paralelismo observado en los cambios de la masa de células β e INGAP-positivas en animales con IR inducida por administración de dieta rica en sacarosa durante 21 días (Del Zotto H y col., 2000, 2002) y el aumento de la masa de células β inducido por administración del pentadecapéptido de INGAP a hamsters normales (Madrid V y col., 2009) y a ratones diabéticos (Rosenberg L y col., 2004).

6.2.2 Experimentos "in vitro": Las ratas control no preñadas y las ratas preñadas aumentaron la secreción de insulina en respuesta al estímulo de glucosa 16,6 mM. Esto demuestra que las células β de las ratas preñadas conservan el mecanismo de regulación de la secreción de insulina, elemento clave para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa (Nolan CJ & Proietto J, 1996; Aerts L y col., 1997). La cantidad de insulina liberada, tanto en presencia de baja como de alta glucosa, aumentó significativamente en las ratas durante la lactancia (M28). Este efecto podría explicarse en parte por el efecto potenciador de la prolactina sobre la secreción de insulina (de Mello MA y col., 2003; Bastemir M y col., 2007; Arumugam R y col., 2008; Huang C y col., 2009.).

El INGAP también estaría involucrado en el cambio de secreción de insulina en respuesta a secretagogos previamente descrito. En este sentido, cabe considerar que en esta etapa de maduración de la función de las células β , el aumento progresivo (en función de la edad) de la cantidad de insulina segregada y el reconocimiento de la concentración de glucosa coinciden con el aumento de la masa de células INGAP-positivas. En la sección dedicada a fetos mencionamos que el efecto modulador del INGAP sobre la secreción de insulina demostrado tanto *in vitro* (Borelli MI y col., 2005; Barbosa H y col., 2006) como *in vivo* (Madrid V y col., 2009), sugiere que los cambios

en la función secretora de las células β estaría condicionado, al menos en parte, por el aumento paralelo registrado en la masa de células INGAP-positivas.

Más allá del aporte al conocimiento brindado por estos resultados, su aplicación permitiría contar con un nuevo enfoque terapéutico potencial de la diabetes.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados de este estudio brindan evidencia experimental de que el INGAP

1. pertenece a la familia REG y que en el hámster coexistirían el REG3 β y el INGAP mientras que en la rata estaría solamente el REG3 β ;
2. aparecería ontogénicamente después del día 11 de gestación;
3. promovería el aumento de la masa de células β en el feto de ratas normales; según datos obtenidos previamente en nuestro grupo, esa acción se ejercería a través de la combinación de un incremento en la replicación y neogénesis de células β y una disminución de su tasa de apoptosis;
4. probablemente también participaría en el mecanismo de maduración funcional de las células β ;
5. en la rata preñada, integraría el grupo de hormonas/reguladores que modifican la masa de células β , pero opuesto a lo ocurrido en el feto, su acción se manifestaría fundamentalmente afectando la replicación y sobre todo la apoptosis, con escasa o nula participación de la neogénesis;
6. al igual que en el feto, también incrementaría la capacidad secretora de las células β .


Vladimir Gladov


DECOTTO HECTOR

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aaboe K, Krarup T, Madsbad S, Holst JJ. GLP-1 physiological effects and potential therapeutic applications. *Diabetes Obes Metab* 10:994-1003,2008.
- Aerts L, Holemans K, Van Assche FA. Maternal diabetes during pregnancy: Consequences for the offspring. *Diab Metab Rev* 16:147-197,1990.
- Aerts L, Vercruyssen L, Van Assche FA. The endocrine pancreas in virgin and pregnant offspring of diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* 38(1):9-19,1997.
- Abe M, Nata K, Akiyama T, Shervani NJ, Kobayashi S, Tomioka-Kumagai T, Ito S, Takasawa S, Okamoto H. Identification of a novel Reg family gene, Reg IIIdelta, and mapping of all three types of Reg family gene in a 75 kilobase mouse genomic region. *Gene* 246(1-2):111-122, 2000.
- Ahlgren U, Jonsson J, Edlund H. The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice. *Development* 122:1409-1416,1996.
- Albisser AM, Leibel BS, Ewart TG, Davidovac Z, Botz CK, Zingg W. An artificial endocrine pancreas. *Diabetes* 23:389-396,1974.
- Amaral ME, Cunha DA, Anhe GF, Ueno M, Carneiro EM, Velloso LA, Bordin S, Boschero AC. Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. *J Endocrinol* 183:469-476 322,2004.
- American Diabetes Association. Gestational Diabetes Mellitus (Position Statement). *Diabetes Care* 32 (Suppl. 1):S62-S67,2009.
- Andrews ZB. Neuroendocrine regulation of prolactin secretion during late pregnancy: easing the transition into lactation. *J Neuroendocrinol* 17:466-473,2005.
- Arumugam R, Horowitz E, Lu D, Collier JJ, Ronnebaums Fleenor P, Freemark M. Glucocorticoids in the regulation of beta-cell gene expression, fatty acid oxidation, and glucose-stimulated insulin secretion: implications for carbohydrate metabolism in pregnancy. *Endocrinology* 149(11):5401-5414,2008.
- Ashcroft FM. Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels. *Annu Rev Neurosci* 11:97-118,1988.

- Asplund KS, Westman S, Hellstrom C. Glucose stimulation of insulin secretion from the isolated pancreas of foetal and newborn rats. *Diabetologia* 5:260-262,1969.
- Asplund KS. The effect of glucose on the insulin secretion in foetal and newborns rats. In: Falkmer SB, Hellman IB, Taljedal eds. *The structure and metabolism of the pancreatic islets*. London: Pergamon Press: 47784,1970.
- Baptista T, de Baptista EA, Lalonde J, Plamondon J, Kin NM, Beaulieu S, Joobar R, Richard D. Comparative effects of the antipsychotics sulpiride and risperidone in female rats on energy balance, body composition, fat morphology and macronutrient selection. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28:1305–1311,2004.
- Barbosa H, Bordin S, Stoppiglia L, Silva K, Borelli M, Del Zotto H, Gagliardino J, Boschero A. Islet Neogenesis Associated Protein (INGAP) modulates gene expression in cultured neonatal rat islets. *Regul Pept* 136:78-84,2006.
- Bastemir M, Akin F, Emral R, Alkis E. Impact of insulin sensitivity in relationship with prolactin and thyroid stimulating hormone. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 115(4):257-260,2007.
- Bihoreau MT, Ktorza A, Kervran A, Picon L. Effect of gestational hyperglycemia on insulin secretion in vivo and in vitro by fetal rat pancreas. *Am J Physiol* 251(1 Pt 1):E86-91,1986.
- Blondeau B, Garofano A, Czernichow P, Breant B. Age dependent inability of the endocrine pancreas to adapt to pregnancy: a long-term consequence of perinatal malnutrition in the rat. *Endocrinology* 140:4208–4213,1999.
- Bonner-Weir S, Deery D, Leahy JL, Weir GC. Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes* 38:49–53,1989.
- Bonner-Weir S. Regulation of pancreatic cell mass in vivo. *Recent Prog Horm Res* 49:91-104,1994.
- Bonner-Weir S, Smith FE. Islet cell growth and the growth factors involved. *Trends Endocrinol Metab* 5:60-4,1994a.
- Bordin S, Amaral ME, Anhe GF, Delghingaro-Augusto V, Cunha DA, Nicoletti-Carvalho JE, Boschero AC. Prolactin-modulated gene expression profiles in pancreatic islets from adult female rats. *Mol Cell Endocrinol* 220:41–50,2004.

- Borelli MI, Stoppiglia LF, Rezende LF, Flores LE, Del Zotto H, Boschero AC, Gagliardino JJ. INGAP-related pentadecapeptide: its modulatory effect upon insulin secretion. Regul Pept 131:97-102,2005.**
- Borelli MI, Del Zotto H, Flores LE, García ME, Boschero AC, Gagliardino JJ. Transcription, expression and tissue binding in vivo of ingap and INGAP-related peptide in normal hamsters. Regul Pept 140:192-7,2007.**
- Bouwens L, Wang RN, De Blay E, Pipeleers DG, Kloppel G. Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas. Diabetes 43:1279–1283,1994.**
- Bouwens L, De Blay E. Islet morphogenesis and stem cell markers in rat pancreas. J Histochem Cytochem 44:947–951,1996.**
- Bowens L, Kloppel G. Islet cell neogenesis. Virchows Arch 427:553-560,1996.**
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254, 1976.**
- Bratusch-Marrain PR, Komjati M, Waldhausl WK. Efficacy of pulsatile versus continuous insulin administration on hepatic glucose production and glucose utilization in type 1 diabetic human. Diabetes 35:922-926,1986.**
- Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, Friesen HG Y Sorenson RL. Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. Endocrinology 132:879–887,1993.**
- Brelje TC, Stout LE, Bhagroo NV, Sorenson RL. Distinctive roles for prolactin and growth hormone in the activation of signal transducer and activator of transcription 5 in pancreatic islets of langerhans. Endocrinology 145:4162–4175,2004.**
- Bruning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. Cell 88:561–572,1997.**
- Burks DJ, White MF. IRS proteins and beta-cell function. Diabetes 50:S140-145,2001.**

- Buteau J. Glp-1 receptor signaling effects on pancreatic beta cell proliferation and survival. *Diabetes Metab* 34(Suppl.2):S73-77,2008.
- Byatt JC, Staten NR, Salsgiver WJ, Kostelc JG, Collier RJ. Stimulation of food intake and weight gain in mature female rats by bovine prolactin and bovine growth hormone. *Am J Physiol* 264:E986–E992,1993.
- Cacho J, Sevillano J, de Castro J, Herrera E, Ramos AP. Validation of simple index to assess insulin sensitivity during pregnancy in Eistar and Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:1269-1276,2008.
- Cardezza AF, Rodriguez RR. Acción local del estradiol sobre los islotes de Langerhans. *Rev Soc Argent Biol* 25:178-182,1949.
- Castellarin ML, Lipsett MA, Petropavlovskaja M, Rosenberg L. The identification and sequence of a new Reg3gamma and Reg2 in the Syrian Golden hamsters. *Biochim Biophys Acta* 1769:579-585,2007.
- Cherif H, Reusens B, Dahri S, Remacle C. A protein-restricted diet during pregnancy alters in vitro insulin secretion from islets of fetal Wistar rats. *J Nutr* 131:1555-1559, 2001.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159,1987.
- Cingolani HE. *Fisiología Humana de Houssay*. Séptima edición. Ed. El Ateneo, 1126 pág., 2000.
- Cohen AM, Teitelbaum A, Rosenman E. Diabetes induced by high fructose diet. *Metabolism* 26:17-24,1977.
- Cohen AM. Genetically determined response to different ingested carbohydrate on the production of diabetes. *Horm Metab Res* 10:86-92,1978.
- Del Zotto H, Massa L, Gomez Dumm CL, Gagliardino JJ. Changes induced by sucrose administration upon the morphology and function of pancreatic islet in the normal hamster. *Diabetes* 47(Suppl 1):A 415,1998.
- Del Zotto H, Massa L, Rafaeloff R, Pittenger GL, Vinik A, Gold G, Reifel-Miller A, Gagliardino JJ. Possible relationship between changes in islet neogenesis and islet neogenesis-associated protein-positive cell mass induced by sucrose administration to normal hamsters. *J Endocrinol* 165:725-33,2000.

- Del Zotto, Gómez Dumm CL, Drago S, Fortino A, Luna GC y Gagliardino JJ. Mecanismo de producción de células B inducido por la administración crónica de sacarosa a ratas normales. Rev Soc Argent de Diabetes 35 (3):103-111,2002.**
- Del Zotto H, Borelli MI, Flores L, García ME, Gómez Dumm CL, Chicco A, Lombardo YB, Gagliardino JJ. Islet neogenesis: an apparent key component of long-term páncreas adaptation to increased insulin demand. J Endocrinol 183:321-330,2004.**
- de Mello MA, Luciano E, Carneiro EM, Latorraca MR, Machado de Oliveira M, Boschero AC. Glucose homeostasis in pregnant rats submitted to dietary protein restriction. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 113-114:229-246,2003.**
- Edlund H. Factors controlling pancreatic cell differentiation and function. Diabetologia 44:1071-1079,2001.**
- Edlund H. Developmental biology of the pancreas. Diabetes 50(Suppl 1):S5-9, 2001a.**
- Flores LE, García ME, Borelli MI, Del Zotto H, Alzugaray ME, Maiztegui B, Gagliardino JJ. Expression of islet neogenesis-associated protein in islets of normal hamsters. J Endocrinol 177:243-248,2003.**
- Freemark M, Driscoll P, Maaskant R, Petryk A, Kelly PA. Ontogenesis of prolactin receptors in the human fetus in early gestation. Implications for tissue differentiation and development. J Clin Invest 99:1107-1117,1997.**
- Freemark M, Avril I, Fleenor D, Driscoll P, Petro A, Opara E, Kendall W, Oden J, Bridges S, Binart N, Breant B, Kelly PA. Targeted deletion of the PRL receptor: effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. Endocrinology 143:1378-1385,2002.**
- Gagliardino JJ, Nierle C, Pfeiffer EF. The effect of serotonin on in vitro insulin secretion and biosynthesis in mice. Diabetologia 10:411-414,1974.**
- Gagliardino JJ, Del Zotto H, Massa L, Reifel-Miller A, Gold G, Vinik AI. Simultaneous increase in B-cell and INGAP-positive cells mass in offspring of sucrose-fed normal hamsters. Diabetes 49 (suppl 1):A415,2000.**
- Gagliardino JJ, Del Zotto H, Massa L, Flores LE, Borelli MI. Pancreatic duodenal homeobox-1 and islet neogenesis-associated protein: a possible combined marker of activateable pancreatic cell precursors. J Endocrinol 177:249-259,2003.**

- Garofano A, Czernichow P, Breant B. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia* 40:1231–1234,1997.
- Garofano A, Czernichow P, Breant B. Effect of ageing on beta-cell mass and function in rats malnourished during the perinatal period. *Diabetologia* 42:711–718,1999.
- Gerardo-Gettens T, Moore BJ, Stern JS, Horwitz BA. Prolactin stimulates food intake in a dose-dependent manner. *Am J Physiol* 256:R276–R280,1989.
- Getty L, Hamilton-Wessler M, Ader M, Dea MK, Bergman RN. Biphasic insulin secretion during intravenous glucose tolerance test promotes optimal interstitial insulin profile. *Diabetes* 47:1941-1947,1998.
- Gómez Dumm CLA, Galeano AM, Genoro S, Gagliardinino JJ. Appearance of immunoreactive endocrine cells during the development of the rat pancreas, with special reference to polypeptide-secreting cells. *Acta Anat* 130:158-162,1987.
- Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1607-1611,2000.
- Graf R, Schiesser M, Reding T, Appenzeller P, Li-Kang L, Fortunato F, Perren A, Bimmler D. Exocrine meets endocrine: pancreatic stone protein and regenerating protein-two sides of the same coin. *J Surg Res* 133:113-120, 2006.
- Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129: 2447-2457,2002.
- Gurr W, Shaw M, Li Y, Sherwin R. RegII is a beta-cell protein and autoantigen in diabetes of nod mice. *Diabetes* 56(1):34-40,2007.
- Guz Y, Montminy MR, Stein R, Leonard J, Gamer LW, Wright CV, Teitelman G. Expression of murine STF-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development* 121:11-18,1995.
- Hamblet NS, Wenjing Shi, Vinik AI, Taylor-Fishwick DA. The Reg family member INGAP is a marker of endocrine patterning in the embryonic pancreas. *Pancreas* 36:1-9,2008.

- Herbert V, Lau KS, Gottlieb CW, Bleicher SJ. Coated charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 25:1375-1384,1965.
- Hermans MP, Schmeer V, Henquin JC. The permissive effect of glucose, tolbutamide and high K⁺ on arginine stimulation of insulin secretion. *Diabetologia* 30:659-665, 1987.
- Holst, JJ. The physiology of Glp-1. *Physiol Rev* 87(4):1409-1439,2007.
- Holst JJ, Deacon CF, Visbøll T, Krarup T, Madsbad S. Glucagon like peptide-1 glucose homeostasis and diabetes. *Trends Mol Med* 14(4):161-168,2008
- Huang C, Snider F, Cross JL. Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy. *Endocrinology* 150(4):1646-1653,2009.
- Jensen J, Hellr RS, Funder-Nielsen T, Pedersen EP, Lindsell C, Weinmaster G, Madsen OD, Serup P. Independent development of pancreatic α and β - cells from Neurogenin3-expressing precursors. A role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes* 49:163-176,2000.
- Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergmann RN, Schwartz MW, Neifing JL, Ward WK, Beard JC, Palmer JP, Porte D Jr. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and β -cell function in human subjects: evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* 42:1663-1672,1993.
- Kahn CR. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 8:1066-84,1994.
- Kaung HL. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev Dyn* 200:163-175,1994.
- Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CV. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* 32:128-134,2002.
- Kervran A, Guillaume M, Jost A. The endocrine pancreas of the fetus from diabetic pregnant rat. *Diabetologia* 5:387-393,1978.
- Kido Y, Nakae J, Accili D. The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab* 86:972-979,2001.

- Krapp A, Knofler M, Frutiger S, Hughes GJ, Hagenbuchle O, Wellauer PK. The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas-specific basic helix-loop-helix protein. *EMBO J* 15:4317-4329,1996.
- Lang DA, Matthews DR, Peto J, Turner RC. Cyclic oscillations of basal plasma glucose and insulin concentrations in human beings. *New Engl J Med* 301:1023-1027,1979.
- Leahy JL. Impaired B cell function with chronic hyperglycemia: Overworked B cell hypothesis. *Diabetes Reviews* 4:298-319,1996.
- Lee HC, Bonner Weir S, Weir GC, Leahy JL. Compensatory adaptation to partial pancreatectomy in the rat. *Endocrinology* 124:1571-1575,1989.
- Li Y, Hansotia T, Yusta B, Ris F, Halban PA, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis. *J Biol Chem* 278:471-478,2003.
- Lombardo YB, Chicco A, Mocchiutti N, de Rodi MA, Nusimovich B, Gutman R. Effect of sucrose diet on insulin secretion in vivo and in vitro and on triglyceride storage and mobilisation of the heart of rats. *Horm. Metab Res* 15:69-76,1983.
- Lombardo YB, Drago S, Chicco A, Fainstein-Day P, Gutman R, Gagliardino JJ, Gómez Dumm CL. Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas. *Metabolism* 45:1527-1532,1996.
- Loubatieres A. effect of prolonged administration of hypoglycemic sulfonamide (chlorpropamide) on the subtotally pancreatectomized dog. In *The Structure and Metabolism of the Pancreatic Islet*. SE Brodin, B Hellman y H Knuston (eds). New York: The Macmillan Company, 437-450, 1964.
- Luo J, Quan J, Tsai J, Hobensack C, Sullivan C, Héctor R, Reaven G. Nongenetic mouse model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 47:663-668, 1998.
- Madrid VG, Del Zotto H, Maiztegui B, Raschia A, Alzugaray ME, Boschero A, Barbosa H, Flores L, Borelli I, Gagliardino JJ. Islet neogenesis-associated protein pentadecapeptide (INGAP-PP): mechanisms involved in its effect upon beta cell mass and function. *Regul Pept* 157:25-31,2009

- Malaisse WJ, Lebrun P, Rasschaert J, Blachier F, Yilmaz T, Sener A. Ketone bodies and islet function: ^{86}Rb handling and metabolic data. *Am J Physiol* 259:E123-130, 1990.
- Marynissen G, Aerts L, Van Assche FA. The endocrine pancreas during pregnancy and lactation in the rat. *J Dev Physiol* 5:373–381, 1983.
- Massa L, Del Zotto H, Gómez Dumm CL, Gagliardino JJ. Postnatal sequential changes in islet morphology and insulin. *Pancreas* 14(1):58-64, 1997.
- Matschinsky FM. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 39:647-652, 1990.
- Matsuda M, Mori T, Sassa S, Sakamoto S, Park MK, Kawashima S. Chronic effect of hyperprolactinemia on blood glucose and lipid levels in mice. *Life Sci* 58:1171–1177, 1996.
- Matthews DR, Naylor BA, Jones RG, Ward GM, Turner RC. Pulsatile insulin has greater hypoglycemic effect than continuous delivery. *Diabetes* 32:617-621, 1983.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412-419, 1985.
- McCarthy AN, Mogilner IG, J. Grigera RI, Borelli MI, Del Zotto H, Gagliardino JJ. Islet neogenesis associated protein (INGAP): Structural and dynamical properties of its active pentadecapeptide. *J Mol Graph Mod* 27:701–705, 2009.
- McEvoy RC and Madson KL. Pancreatic insulin-, glucagon-, and somatostatin-positive islet cell populations during the perinatal development of the rat. I. Morphometric quantitation. *Biol Neonate* 38:248–254, 1980.
- McEvoy RC. Changes in the volumes of the A-, B-, and D-cell populations in the pancreatic islets during the postnatal development of the rat. *Diabetes* 30:813-817, 1981.
- Mc Kinnon CM, Docherty K. Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia* 44:1203-1214, 2001.

- Miyaura C, Chen L, Appel M, Alam T, Inman L, Hughes SD, Milburn JL, Unger RH, Newgard CB. Expression of reg/PSP, a pancreatic exocrine gene: relationship to changes in islet beta-cell mass. *Mol Endocrinol* 5:226-234,1991.
- Montanya E, Nacher V, Biarnes M, Soler J. Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* 49:1341–1346,2000.
- Mornagui B, Grissa A, El FS, Gharib C, Kamoun A, Gharbi N. Age related metabolic development in rats: insulin's role. *Tunis Med* 82:717-724,2004.
- Nielsen JH, Serup P. Molecular basis for islet development, growth and regeneration. *Curr Opin Endocrinol Diab* 5:97-107,1998.
- Nolan CJ, Proietto J. The set point for maternal glucose homeostasis is lowered during late pregnancy in the rat the role of islet beta-cell and liver. *Diabetologia* 39(7):785-792,1996.
- O'Connor MD, Landhal J, Grodsky GM. Comparison of storage and signal limited models of pancreatic insulin secretion. *Am J Physiol* 238:R378-389,1980.
- Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 122: 983-995,1996.
- Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T. IPF1, a homeodomain containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J.* 12:4251-4259,1993.
- Okamoto H. The Reg gene family and Reg proteins: with special attention to the regeneration of pancreatic beta-cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 6:254-262, 1999.
- Orci L. The insulin factory: A tour of the plant surroundings and a visit to the assembly line. *Diabetologia* 28:528-546,1985.
- Otani K, Kulkarni RN, Baldwin AC, Krutzfeldt J, Ueki K, Stoffel M, Kahn CR, Polonsky KS. Reduced beta-cell mass and altered glucose sensing impair insulin-secretory function in β IRKO mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E41–E49,2004.
- Padidela R, Patterson M, Sharief N, Ghatei M, Hussain K. Elevated basal and post-feed glucagon-like peptide 1 (GLP-1) concentrations in the neonatal period. *Eur J Endocrinol* 160(1):53-8,2009.

- Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. Adaption of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* 130:1459-1466,1992.
- Perfetti R, Raygada M, Wang Y, Zenilman ME, Egan JM, Denno KM, Sadler TW, Shuldiner AR. Regenerating (reg) and insulin genes are expressed in prepancreatic mouse embryos. *J Mol Endocrinol* 17(1):79-88,1996.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:2002-2007,2001.
- Picon L, Montane M. Fetal and maternal glycemia in rats at different stages of gestation. Action of insulin injected into the fetus when it becomes hyperglycemic. *Cr Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 267:860-863,1968.
- Pictet R, Rutter WJ. Development of the embryonic endocrine pancreas. In *Handbook of Physiology. Section 7, Vol. 1* (eds. D. Steiner and N. Freinkel), 25-66. Baltimore: Williams & Williams, 1972.
- Pittenger GL, Vinik AI, Rosenberg L. The partial isolation and characterization of isletotropin, a novel islet-specific growth factor. *Adv Exp Med Biol* 321:123-30,1992.
- Rafaeloff R, Pittenger GL, Barlow SW, Qin XF, Yan B, Rosenberg L, Duguid WP, Vinik AI. Cloning and sequencing of the pancreatic islet neogenesis associated protein (INGAP) gene and its expression in islet neogenesis in hamsters. *J Clin Invest* 99:2100-9,1997.
- Reusens B, Hoet JJ, Remacle C. Anatomy, developmental biology and pathology of pancreatic islets. In: LJ De Groot, et al. (eds). *Endocrinology*. Philadelphia: Saunders and Co, 5024-5032,2000.
- Rolin B, Larsen MO, Gotfredsen CF, Deacon CF, Carr RD, Wilken M, Knudsen LB. The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases B cell mass in diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E745-E752,2002.
- Rosenberg L, Brown RA, Duguid WP. A new model for the development of duct epithelial hyperplasia and the initiation of nesidioblastosis. *J Surg Res* 35:63-72, 1983.
- Rosenberg L. Neogenesis of beta cells from pancreatic ductal cells. *Cell Transplant* 4:371-384,1995.

- Rosenberg L, Lipsett M, Yoon JW, Prentki M, Wang R, Jun HS, Pittenger GL, Taylor-Fishwick D, Vinik AI. A pentadecapeptide fragment of islet neogenesis-associated protein increases beta-cell mass and reverses diabetes in C57BL/6J mice. *Ann Surg* 240:875-84,2004.
- Royster M, Driscoll P, Kelly PA, Freemark M. The prolactin receptor in the fetal rat: cellular localization of messenger ribonucleic acid, immunoreactive protein, and ligand-binding activity and induction of expression in late gestation. *Endocrinology* 136:3892-3900,1995.
- Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 365-386, 2000.
- Ruiz Maximino. *Diabetes Mellitus*. Editorial Akadia. 636 pág, 2004.
- Saad MJ, Boschero AC. Prolactin-signal transduction in neonatal rat pancreatic islets and interaction with the insulin-signaling pathway. *Horm Metab Res* 35:282-289, 2003.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis TE. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.
- Sander M, Sussel L, Connors J, Scheel D, Kalamaras J, Dela Cruz F, Schwitzgebel V, Hayes-Jordan A, German M. Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development* 127:5533-5540,2000.
- Scaglia L, Smith FE, Bonner-Weir S. Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology* 136:5461-5468,1995.
- Scaglia L, Cahill CJ, Finegood DT, Bonner-Weir S. Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology* 138:1736-1741,1997.
- Schwitzgebel VM, Scheel DW, Connors JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, Sussel L, Johnson JD, German MS. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 127:3533-3542,2000.

- Serri O, Li L, Mamputu JC, Beauchamp MC, Maingrette F, Renier G. The influences of hyperprolactinemia and obesity on cardiovascular risk markers: effects of cabergoline therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64:366–370,2006.
- Shafir E, Ben-Sasson R, Bar-On H. Insulin resistance, B-cell survival, and apoptosis in type 2 diabetes: animal models and human implications. *Diabetes* 7:117-23,1999.
- Shao J, Qiao L, Friedman JE. Prolactin, progesterone, and dexamethasone coordinately and adversely regulate glucokinase and cAMP/PDE cascades in MIN6-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E304–E310,2004.
- Sharma A, Zangen DH, Reitz P, Taneja M, Lissauer ME, Miller CP, Weir GC, Habener JF, Bonner-Weir S. The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. *Diabetes* 48:507–513,1999.
- Silva KE, Barbosa HC, Rafacho A, Bosqueiro JR, Stoppiglia LF, Carneiro EM, Borelli MI, Del Zotto H, Gagliardino JJ, Boschero AC. INGAP-PP up-regulates the expression of genes and proteins related to K⁺ATP channels and ameliorates Ca²⁺ handling in cultured adult rat islets. *Regul Pept* 148(1-3):39-45,2008.
- Soltani N, Kumar M, Glinkay , Prud' homme GJ, Wang Q. In vivo expression of Glp-1/IgG Fc fusion protein enhances beta cell mass and protects against streptozotocine-induced diabetes. *Gene Ther* 12:981-988,2007.
- Sorenson RL, Brelje TC. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm Metab Res* 29:301–307,1997.
- Sorenson RL, Brelje TC. Regulation of pancreatic islets by prolactin, growth hormone and placental lactogen. In: Horseman ND, ed. *Prolactin*. Boston: Kluwer 297–316, 2001.
- Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner- Weir S, Habener JF, Egan JM. Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increases islet size in mouse pancreas. *Diabetes* 49:741–748,2000.
- Svensson AM, Bodin B, Andersson A, Jansson L. Pancreatic islet blood flow during pregnancy in the rat: an increased islet mass is associated with decreased islet blood flow. *J Endocrinol* 180:409–415,2004.

- Swenne I, Eriksson U. Diabetes in pregnancy: islet cell proliferation in the fetal rat pancreas. *Diabetologia* 23:525–528,1982.
- Taniguchi S, Tanigawa K, Miwa I. Immaturity of glucose-induced insulin secretion in fetal rat islets is due to low glucokinase activity. *Horm Metab Res* 32:97-102,2000.
- Taylor-Fishwick DA, Rittman S, Kendall H, Roy L, Shi W, Cao Y, Pittenger GL, Vinik AI. Cloning genomic INGAP: a Reg-related family member with distinct transcriptional regulation sites. *Biochim Biophys Acta* 1638(1):83-89,2003.
- Taylor-Fishwick DA, Shi W, Pittenger GL, Vinik AI. Pdx-1 can repress stimulus-induced activation of the INGAP promoter. *J Endocrinol* 188(3):611-621,2006.
- Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S, Shiga K, Yonemura Y, Tochino Y, Okamoto H. A novel gene activated in regenerating islet *J Biol Chem* 263:2111-2114,1988.
- Terazono K, Uchiyama Y, Ide M, Watanabe T, Yonekura H, Yamamoto H, Okamoto H. Expression of reg protein in rat regenerating islets and its co-localization with insulin in the beta cell secretory granules. *Diabetologia* 33(4):250-252,1990.
- Van Assche FA, Aerts L, De Prins F. A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 85:818–820,1978.
- Van Assche FA, Gepts W, Aerts L. Immunocytochemical study of the endocrine pancreas in the rat during normal pregnancy and during experimental diabetic pregnancy. *Diabetologia* 18:487–491,1980.
- Vinik AI, Pittenger GL, Rafaeloff R, Rosenberg L, Duguid WP. Determinants of pancreatic islet cell mass. *Diab Rev* 4:235–263,1996.
- Wang RN, Bowens L, Kloppel G. Beta cell proliferation in normal and streptozotocin-treated newborn rats: site, dynamics and capacity. *Diabetologia* 37:1088-1096, 1994.
- Wang RN, Kloppel G, Bouwens L. Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia* 38:1405–1501,1995.
- Wang RN, Bouwens L, Kloppel G. Beta cell growth in adolescent and adult rats treated with streptozotocin during the neonatal period. *Diabetologia* 39:548–557,1996.
- Wang Q, Brubaker PL. Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice. *Diabetologia* 45:1263–1273,2002.

Weinhaus AJ, Stout LE, Sorenson RL. Glucokinase, hexokinase, glucose transporter 2, and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin-treated islets in vitro: mechanisms for long-term up-regulation of islets. *Endocrinology* 137:1640–1649,1996.

Weinhaus AJ, Stout LE, Bhagroo NV, Brelje TC, Sorenson RL. Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactin: a mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy. *J Endocrinol* 193:367–381,2007.

Weir G, Bonner-Weir S. Five stages of evolving B cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 53 (Suppl. 3): S16-S210, 2004.

Wessells NK, Cohen JH. Early ancreas organogenesis: morphogenesis, tissue interaction and mass effects. *Dev Biol* 15:237-270,1967.

Withers DJ, White M. Perspective: The insulin signaling system—a common link in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrinology* 141:1917-1921,2000.

Xiang AH, Peters RK, Kjos SL, Goico J, Ochoa C, Marroquin A, Tan S, Hodis HN, Azen SP, Buchanan TA. Pharmacological treatment of insulin resistance at two different stages in the evolution of type 2 diabetes: impact on glucose tolerance and beta-cell function. *J Endocrinol Metab* 89:46-51,2004.

Yavuz D, Deyneli O, Akpınar I, Yildiz E, Gozu H, Sezgin O, Haklar G, Akalin S. Endothelial function, insulin sensitivity and inflammatory markers in hyperprolactinemic pre-menopausal women. *Eur J Endocrinol* 149:187–193,2003.


Viviana Garcia
Tesisista


DEL ZOTTO HECTOR
DIRECTOR DE TESIS


SUSANA MOSCA
CO-DIRECTOR DE TESIS