T
353

24855

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Casa Abierta al Tiempo

PARTICIPACIÓN DE L-ARGININA Y POLIAMINAS EN LA RECUPERACIÓN DE LA FUNCIÓN PANCREÁTICA EN RATAS TRATADAS CON ALOXANA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T A

M. EN C. ROBERTO DE ARO HERNÁNDEZ

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR: DR. JOSÉ DOMINGO MÉNDEZ FRANCISCO

ASESOR: DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS

ASESOR: DR. ARTURO BAIZA GUTMAN

MÉXICO, D.F ABRIL, 2004

EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA ESTÁ EN EL PADRÓN DE POSGRADOS DE EXCELENCIA DEL CONACYT, Y ADEMÁS CUENTA CON APOYO DEL MISMO CONSEJO, CON EL CONVENIO NUM. PFR-200-93.
ROBERTO DE ARO HERNÁNDEZ RECIBIÓ UNA BECA OTORGADA POR EL CONACYT PARA LA REALIZACIÓN DE SU TRABAJO DOCTORAL (NÚMERO DE REGISTRO: 91707)

El jurado designado por la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas de las Unidades Xochimilco e Iztapalapa aprobó la tesis que presentó:

Roberto De Aro Hernández

El dia 27 de Abril del 2004

Comité Tutorial:

Tutor: Dr. José Domingo Méndez Francisco _____

Asesor: Dr. Rubén Román Ramos _____

Asesor: Dr. Luis Arturo Baiza Gutman _____

Sinodal: Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar _____

Sinodal: Dr. Ramón González Camarena _____

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES METABÓLICAS DEL HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL IMSS. PARA SU REALIZACIÓN SE CONTÓ CON APOYO DEL FOFOI (PROYECTO FP-0038/731 e IMSS-2002/223) Y FP 0314 DE LABORATORIOS SILANES, S. A. de C V

A QUIENES DESEARON Y/O PARTICIPARON
EN HACER QUE UN SUEÑO TAN GRANDE SE
CONVIRTIERA EN REALIDAD, Y A QUIENES, SI
ESTUVIERAN CON VIDA, LO DESEARÍAN
TANTO COMO YO.

CUANDO FUI ESTUDIANTE DE PREPARATORIA
Y NO SABÍA DE MAESTRÍAS Y DOCTORADOS
ME PROPUSE OBTENER EL GRADO MÁS ALTO
QUE EXISTIERA. GRACIAS, NUEVAMENTE, A QUIENES
ME IMPULSARON Y/O ME MOSTRARON EL
CAMINO PARA LLEGAR.

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTA TESIS

Existen numerosos términos utilizados en ciencia que primero surgieron en el idioma inglés. Aunque se han creado sus equivalentes en español, algunas ocasiones utilizamos las siglas en su idioma original; en algunas ocasiones, y debido a que los términos científicos provienen del griego o del latín, éstos se abrevian igual en ambos idiomas.

ABREVIATURA	INGLÉS	ESPAÑOL
A.D.A	American Diabetes Association	Asociación Americana de Diabetes
ADP	Adenosine diphosphate	Difosfato de adenosina
ATP	Adenosin trisphosphate	Trifosfato de adenosina
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine	5-bromo-2'-desoxiuridina
$[Ca^{2+}]_i$	Intracellular free calcium concentration	Concentración de calcio libre intracelular
CoA	Coenzyme A	Coenzima A
CD	Cluster of Differentiation	----------
DAB	3,3'-Diaminobenzidine	3,3'-Diaminobencidina
DFMO	Difluoromethylornithine	Difluorometilornitina
DNA	Deoxyribunucleic acid	Ácido desoxiribonucleico
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor	Factor relajante derivado del endotelio
EGF	Epidermal growth factor	Factor de crecimiento epidérmico
FAD	Flavine adenine dinucleotide	Dinucleótido de flavina y adenina

FMN	Flavine mononucleotide	Mononucleótido de flavina y adenina
G	Gap or growth	Crecimiento
GABA	Gamma amino butiric acid	Ácido gama amino butírico
GP	Glutathion peroxidase	Glutatión peroxidasa
HCl	Hydrochloric acid	Ácido clorhídrico
HDL	High density lipoprotein	Lipoproteína de alta densidad
H_2O_2	Hydrogen peroxide	Peróxido de hidrógeno
ICE	Interleukin1β-converting enzyme	Enzima convertidora de IL-1β
IGF	Insulin-like growth factor	Factor de crecimiento semejante a la insulina
IL	Interleukine	Interleucina
INF	Interferon	Interferón
i.m.	Intramuscular	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal	Intraperitoneal
K	Potassium	Potasio
LDL	Low density lipoprotein	Lipoproteína de baja densidad
M	Molar	Molar
MCP	Monocyte chemoattractant protein	Proteína quimioatrayente de monocitos
N	Normal (equivalents/liter)	Normal (equivalentes/litro)
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADPH	Reduced nicotinamide adenine dicucleotide phosphate	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido
NaCl	Sodium chloride	Cloruro de sodio

NO	**N**itric **o**xide	Óxido nítrico
NOS	**N**itric **o**xide **s**ynthase	Óxido nítrico sintasa
O_2	Molecular Oxygen	Óxigeno molecular
O_2-•	Superoxide anion radical	Anión radical superóxido
$^1O_2$	**O**xygen in singlet state	Oxígeno en estado de singulete
ODC	**O**rnithine **d**ecarboxylase	Ornitina descarboxilasa
OH•	Hydroxyl radical	Radical hidroxilo
PBS	**P**hosphate-**b**uffered **s**aline	Solución salina amortiguada con fosfatos
PDGF	**P**latelet-**d**erived **g**rowth **f**actor	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
pH	Hydrogen ion potential	Potencial de iones hidrógeno
Pdx	**P**ancreatic **d**uodenal homeobo**x**	Homeobox pancreático duodenal
ROS	**R**eactive **o**xygen **s**pecies	Especies reactivas de oxígeno
S	**S**ynthesis	Síntesis
SAMD	**S**-adenosyl**m**ethionine **d**ecarboxylase	S-adenosilmetionina descarboxilasa
SOD	**S**uperoxide **d**ismutase	Superóxido dismutasa
TGF	**T**ransforming **g**rowth **f**actor	Factor de crecimiento transformante
TNF	**T**umor **n**ecrosis **f**actor	Factor de necrosis tumoral

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
Secreción endocrina y exocrina del páncreas	5
Diabetes mellitus	6
Factores que modifican la función pancreática	7
Insulitis	8
Especies reactivas de oxigeno	9
Interleucina-1β	11
L-arginina	12
Óxido nítrico	13
Efectos de la IL-1β sobre las células β	14
Diabetes experimental ocasionada por aloxana	15
Poliaminas	16
Distribución de poliaminas	17
Biosíntesis e interconversión	18
Poliaminas y diabetes experimental	21
Regeneración de la célula β	23
Neogénesis	23
Evaluación de la proliferación celular	25
Modelos experimentales para estudiar la regeneración pancreática	26

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 27

JUSTIFICACIÓN 28

HIPÓTESIS 29

OBJETIVO GENERAL 29

OBJETIVOS PARTICULARES 29

MATERIAL Y MÉTODOS 31

Modelo experimental 31

Inducción de hiperglucemia 31

Esquema metodológico 32

Administración de L-arginina y poliaminas 33

Evaluación inmunohistoquímica y determinación de la glucemia, hipertrigliceridemia y colesterolemia 33

Técnica inmunohistoquímica 34

Determinación del índice de incorporación de BrdU 36

Análisis estadístico 37

RESULTADOS 38

Peso corporal y parámetros bioquímicos 38

Cambios histológicos inducidos por aloxana 42

Cambios regeneretivos 42

Neogénesis de células β a partir de células ductales 44

Neogénesis de células β a partir decélulas acinares 44

Regeneración de células β intrainsulares 48

Replicación de células acinares 52

DISCUSIÓN 55

CONCLUSIONES 64

REFERENCIAS 65

APÉNDICE A
Procesamiento del tejido para microscopía de luz 84

APÉNDICE B
Técnica inmunohistoquímica 86

APÉNDICE C
Solución de formaldehído (formol) amortiguado al 10% 92

APÉNDICE D
Solución salina amortiguada con fosfatos 93

PUBLICACIONES GENERADAS DE ESTA TESIS 95

RESUMEN

A las poliaminas se les considera constituyentes esenciales de todos los organismos vivos y se les ha relacionado con procesos de crecimiento, división y diferenciación celular. Estas participan en la síntesis de DNA así como en la síntesis de proteínas y prácticamente toda célula tiene la capacidad de incorporar, sintetizar o metabolizar poliaminas. En las células β las poliaminas participan en la síntesis de insulina y se elevan en respuesta a estímulos mitogénicos como la glucosa y la hormona del crecimiento. Sin embargo, los efectos de las poliaminas en las células β no han sido del todo estudiados y se requieren más investigaciones a fin de establecer qué funciones juegan en dichas células. En este trabajo analizamos la posibilidad de que las poliaminas potencien o aceleren los procesos de regeneración y neogénesis de las células β pancreáticas en ratas con hiperglucemia temporal inducida con aloxana. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley machos de 300 ± 10 g, las que recibieron una dosis de aloxana de 120 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal y la administración del aminoácido L-arginina (precursor de las poliaminas), o bien las poliaminas putrescina, espermidina y espermina inmediatamente después de la administración de aloxana y diariamente (1 ml de L-arginina 10 mM o poliaminas 10 μM en solución salina 0 154 M). Los animales se sacrificaron en el dia cero antes de recibir aloxana (grupo control normal) y a los días 3, 6, 9 y 12 de tratamiento (grupo control con hiperglucemia temporal y grupos experimentales). Se procedió a analizar parámetros bioquímicos indicadores de la función endocrina pancreática, como son las concentraciones séricas de glucosa, triglicéridos y colesterol total. También se evaluaron la regeneración de las células β intrainsulares y la replicación de las células acinares mediante el análisis histológico de la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina por los núcleos de las células

en división, simultáneamente con la detección inmunohistoquímica de insulina para la identificación de las células β.

Los parámetros bioquímicos indicaron que las ratas se recuperan de la hiperglucemia inducida por aloxana en un lapso de 12 días, lo que estuvo asociado a un aumento en la proliferación tanto de las células β como de las células acinares del páncreas.

La L-arginina y las poliaminas mitigan el aumento marcado en la glucemia, trigliceridemia y colesterolemia que se observa a los tres días después del tratamiento con aloxana. La L-arginina estimula la incorporación de BrdU por las células acinares pero no por las células β. Considerando estos datos, es probable que el efecto principal de las poliaminas sea disminuir el daño inicial causado por la aloxana a las céluas β intrainsulares. Adicionalmente, la arginina promueve la aparición de células β extrainsulares y la putrescina y la espermina promueven la neogénesis de células β a partir de células ductales y no se encontró asociación alguna entre cualquiera de las poliaminas y los índices de incorporación de BrdU por la células acinares y β.

Palabras Clave: L-arginina, Poliaminas, Célula β, Aloxana, Regeneración, Neogénesis, Células ductales.

ABSTRACT

Polyamines are considered esential constituents of all living organisms and have been involved in cellular growth, replication and differentiation. These substances participate in the synthesis of DNA, as well as in the synthesis of proteins and practically all cell has the capacity to incorporate, synthesize or metabolize polyamines. In β-cells polyamines participate in the synthesis of insulin and rise in response to mitogenic stimuli as glucose and growth hormone. However, the physiological roles of polyamines on the β-cells are not completely understood, so that more research is urgently needed. Here, we analyze the possibility that the polyamine administration potentiate or accelerate the regeneration and neogenesis of pancreatic β cells in temporarily hyperglycemic rats. Male Sprague-Dawley rats weighing 300 ± 10 g were used, which received an alloxan dose of 120 mg/kg body weight, followed by a daily admnistration of 1 ml 10 mM L-arginine or 10 μM putrescine, spermidine or spermine in 0.154 M saline solution, starting immediately after the alloxan administration. Rats were killed on day 0 before the alloxan administration (healthy control group) or at days 3, 6, 9 or 12 (temporarily hyperglycemic control and experimental groups) after the alloxan administration. At these time points their endocrine pancreatic function was evaluated by biochemical parameters, such as the seric concetration of glucose, triglycerides and total cholesterol. The regeneration of the β and acinar cells during this time period was also measured, which was carried out by the histological analysis of bromodeoxyuridine incorporation by nuclei of cells dividing, simultaneously with the immunohistochemical detection of insulin for the identification of β-cells.

Biochemical parameters indicated that alloxan-treated rats progressively recover from the hyperglycemic state, which was associated to an increase in the proliferation of both β- and acinar pancreatic cells.

Both L-arginine and polyamines mitigate the steep increase in the seric concentrations of glucose, triglycerides and total cholesterol that occurs on day three after the treatment of alloxan. L-arginine increases the BrdU-labeling index of acinar but not of β-cells. Considering these data, it is plausible that the principal action of polyamines and maybe also of L-arginine is to diminish the initial damage caused by alloxan to intrainsular β-cells. Additionally, L-arginine promotes the appearance of extrainsular β-cells and both putrescine and spermine promote neogenesis of β-cells from ductal cells and no association was shown between any of the polyamines and the BrdU-labeling indexes of acinar and β-cells

Key Words: L-arginine, Polyamines, β-cell, Alloxan, Regeneration, Neogenesis, Ductal cells.

INTRODUCCIÓN

Secreción endocrina y exocrina del páncreas

El páncreas es una glándula tanto exocrina como endocrina. La secreción exocrina consta de enzimas sintetizadas por los acinos pancreáticos y liberadas al duodeno. Éstas contribuyen a la digestión de los alimentos. La secreción endocrina, por otra parte, la constituyen diversas hormonas que participan en la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Dichas hormonas son producidas y liberadas por las células de los islotes de Langerhans, pequeños grupos celulares dispersos entre los acinos pancreáticos, cada uno formado por un grupo de células β, rodeado de otros tipos celulares endocrinos. Las células α secretan glucagón, las células β secretan insulina, las células δ secretan somatostatina y las células pp secretan el polipéptido pancreático. Los islotes de Langerhans presentan, además, otros tipos celulares no endocrinos, incluyendo fibroblastos y macrófagos. El volumen de los islotes comprende del 1 al 2% del tejido pancreático, mientras que las células β constituyen de un 60 a un 70% de la población celular de los islotes de Langerhans (Lacy, 1967).

En los mamíferos la insulina es sintetizada exclusivamente por las células β pancreáticas y cumple la función de regular de manera muy precisa los niveles de la glucosa sanguínea. Cuando por alguna razón disminuye o cesa completamente su producción y liberación al sistema circulatorio, o bien no cumple la función esperada, el individuo presenta síntomas característicos de diabetes mellitus, como son: altas concentraciones de glucosa en el plasma sanguíneo, polidipsia y polifagia (Bach, 1994).

Diabetes mellitus.

El funcionamiento de las células β de los islotes de Langerhans suele verse afectada en el humano. Existen más de 100 millones de personas diabéticas en el mundo y en México la diabetes afecta al 8.18% de los adultos (Aguilar-Salinas y col., 2003).

La diabetes ha sido reclasificada por la A.D.A. en 1997, quienes la consideran como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por presentar hiperglucemia y que se asocian con defectos en la secreción de insulina, defectos en su acción o ambas. Asi, ahora se reconoce que no solamente los pacientes diabéticos tipo 1, requieren de insulina, sino que esta hormona puede también ser recomendada para los pacientes con diabetes tipo 2, antes considerados no dependientes de insulina. Esta última clasificación considera cuatro clases principales de diabetes: a) diabetes mellitus tipo 1, b) la tipo 2, c) otros tipos específicos y d) la gestacional.

La diabetes tipo 1 se caracteriza por una infiltración masiva de linfocitos en los islotes de Langerhans, la reacción de anticuerpos circulantes con antígenos de las células β y la subsecuente destrucción de éstas por los linfocitos T, los que muy probablemente reconocen anticuerpos en las células β, con esto disminuye notablemente su número, ocasionando una disminución marcada en la concentración sanguínea de insulina y un concomitante aumento en la concentración de glucosa (Krolewski y col. 1987; Bach, 1994; Atkinson y Maclaren, 1996). Además de los fenómenos autoinmunes, la destrucción de las células β puede facilitarse por cierta susceptibilidad genética e incidencia de infecciones virales y por una particular susceptibilidad de estas células a sustancias derivadas de la reducción parcial del oxígeno, conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS). Los signos y síntomas que caracterizan a un paciente con diabetes tipo 1 son: hiperglucemia,

poliuria, polidipsia, polifagia, astenia, insulinopenia y pérdida de peso. Además, al momento del diagnóstico suele haber una franca cetoacidosis y una reducción en la densidad de las células productoras de insulina de hasta el 90%. La incidencia de la diabetes tipo 1 es solamente del 10% de los pacientes diabéticos y afecta a más de 10 millones de personas en todo el mundo, lo que ha propiciado la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento adicionales a la administración continua de insulina.

La diabetes tipo 2 se caracteriza por una marcada resistencia a la insulina en los tejidos blanco, como el músculo, hígado y tejido adiposo (Reaven, 1995; Ferrannini, 1998;) y recientemente se ha reconocido que la célula β debe también experimentar daño para que ésta se desarrolle. Así, la célula productora de insulina es actualmente el centro de la atención de muchos investigadores, siendo primordial conocer lo más posible de ella, a fin de poder encontrar la forma de detener el desarrollo de cualquier tipo de diabetes mellitus.

Factores que modifican la función pancreática

Algunos factores que afectan la función de las células β son los productos de secreción de los linfocitos y macrófagos que se infiltran a los islotes pancreáticos (insulitis), lo que ocurre desde las fases iniciales de la diabetes tipo 1. Entre estas sustancias se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS), las interleucinas (IL) y otras citocinas que dañan a las células productoras de insulina (Rabinovitch, 1998; Eizirik y Darville, 2001). Por otra parte, las sustancias que estimulan a las células β para secretar insulina o bien para replicarse son la glucosa, los aminoácidos, la hormona del crecimiento, algunos factores de crecimiento y las poliaminas, entre otras (Sjöholm, 1993; Bonner-Weir, 1994).

A continuación se describirán con mayor detalle los factores más importantes que se sabe que alteran o pueden alterar la función pancreática.

Insulitis

La diabetes mellitus tipo 1, también llamada diabetes autoinmune, se presenta como una reacción de pérdida de tolerancia inmune en la que se forman anticuerpos contra las células β pancreáticas (Bach, 1994, 1995; Atkinson y McLaren, 1996). En la etapa inicial, antes de manifestarse los primeros síntomas característicos de la enfermedad, tanto en humanos como en modelos animales ocurre la infiltración masiva de macrófagos y linfocitos CD8+ y CD4+ en los islotes de Langerhans, lo que recibe el nombre de insulitis, un evento esencial en la destrucción de las células β (Bach, 1994, 1995; Atkinson y McLaren, 1996). En modelos animales de diabetes tipo 1 tales como el ratón no obeso y en la rata bioseleccionada, la inactivación de los macrófagos antes de que se presenten los primeros síntomas de la enfermedad, impide tanto la insulitis como el desarrollo de la diabetes (Yoon y col., 1998). En estos animales se ha demostrado que los macrófagos activados producen IL-12, que activa a los linfocitos CD4+ (CD: cluster of differentiation), éstos secretan interferón γ (INF-γ) e IL-2. El INF-γ activa a otros macrófagos, los que secretan IL-1β, TNF-α, ROS y óxido nítrico (NO), mientras que la IL-2 atrae a linfocitos CD8+. Los linfocitos CD8+ se diferencian a células T citotóxicas, las que inducen la muerte de las células β pancreáticas (Yoon y col., 1998; Rabinovitch, 1998)

Especies reactivas de oxígeno (ROS)

El término especies reactivas de oxígeno agrupa a los radicales libres que contienen oxígeno, como son el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) y el radical hidroxilo (OH•), así como al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al oxígeno (O_2) en estado de singulete ($^1O_2$), que si bien estos dos últimos no son radicales libres, son altamente reactivos y pueden dar origen a ellos (Cadenas, 1989). Estudios con modelos y sistemas biológicos *in vitro* e *in vivo*, han demostrado que las ROS son potencialmente tóxicas cuando exceden los niveles fisiológicos puesto que pueden reaccionar con los constituyentes de la célula, dañando en ocasiones irreversiblemente su estructura y función (Andreoli, 2000).

Para evitar o aminorar los efectos de las ROS, las células poseen mecanismos de defensa de varios tipos, distribuidos en sus diferentes estructuras. Entre estos mecanismos de defensa se encuentran las enzimas superóxido dismutasas (SODs), la catalasa y un grupo de enzimas llamadas peroxidasas. Las SODs son metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical anión superóxido para formar O_2 y H_2O_2. En las células eucariontes existen dos tipos de SODs; una es citoplásmica y contiene cobre y zinc en su sitio activo y se le denomina CuZn-SOD, la otra es mitocondrial y contiene manganeso en su sitio activo, por lo que se le denomina Mn-SOD (Roberts y col., 1991). La catalasa reduce el H_2O_2 para formar agua y oxígeno molecular. Las peroxidasas oxidan una amplia gama de sustratos para formar agua a partir del H_2O_2 (Krinsky, 1992).

Las células β son muy sensibles a las ROS debido a que contienen niveles bajos de enzimas antioxidantes (Asayama y col., 1986; Lenzen y col., 1996). Se ha demostrado que las SODs presentan sólo el 30% de la actividad encontrada en el hígado, en tanto que la catalasa y la glutatión peroxidasa se detectan en niveles extremadamente bajos (Tiedge y

col , 1997). Existen evidencias que sugieren la participación de las ROS como mediadoras del daño producido por las citocinas a las células β (Rabinovitch y Suarez-Pinzon, 1998; Ebelt y col., 2000). Las ROS son formadas por los macrófagos residentes o infiltrantes activados y por la célula β como resultado de la acción de las citocinas (Sumoski y col., 1989; Suarez-Pinzon y col., 1997). Estudios *in vitro* han demostrado que las ROS interfieren con las enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa (Nakasaki y col., 1995). En el ratón se encontró que el H_2O_2 disminuye el cociente de ATP/ADP, lo que lleva a la apertura de los canales de K^+ sensibles a ATP, a la hiperpolarización de la membrana y a la inhibición de la secreción de insulina (Krippeit-Drews y col., 1999; Nakasaki y col., 2000). Se ha propuesto también que la disfunción de las células β pancreáticas ocurre probablemente a través de la citotoxicidad del radical OH•, producido por la acción del TNF-α y/o el INF-γ sobre la célula β, que está involucrado en la expresión del antígeno clase II del complejo mayor de histocompatibilidad y en la disminución de los niveles del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) (Yamada y col., 1993). En 1992 Rabinovitch y col. encontraron que la administración combinada de IL-1β, TNF-α y INF-γ en islotes de rata favorece el aumento de malondialdehído, un producto de la lipoperoxidación, lo que significa que la lipoperoxidación es un mecanismo de la toxicidad de las citocinas. Trabajos subsecuentes reforzaron sus observaciones (Ravinovitch y col., 1996; Suarez-Pinzon y col., 1996). Esto llevó a crear animales, islotes o líneas celulares transgénicos que sobreexpresan la CuZn-SOD (Kubisch y col., 1994), la catalasa (Xu y col., 1999), o la combinación de las enzimas catalasa-glutatión peroxidasa (GP) y catalasa-CuZn-SOD (Tiedge y col., 1998), resultando que la acción complementaria de dos enzimas proporciona mayor protección a varias ROS.

Interleucina-1β

Las interleucinas (IL) son citocinas, proteínas o glucoproteínas de bajo peso molecular secretadas por los leucocitos y otros tipos celulares en respuesta a estímulos inmunogénicos (Goldsby y col., 2000). El término interleucina originalmente se aplicó a sustancias que son secretadas por leucocitos y que se creía que sólo tenían efecto sobre otros leucocitos. Con el transcurso del tiempo y como resultado de múltiples experimentos, se demostró que otras células también pueden sintetizar y liberar interleucinas, por tal razón, dicho nombre parecería inadecuado, sin embargo ha sido tan usado que resultó conveniente conservarlo. Ciertamente, mientras otros términos como linfocinas y monocinas tienden a desaparecer, el número de interleucinas continúa aumentando y hasta ahora se han identificado 18 de ellas (Brennan y Feldmann, 1996; Abbas y col., 2000).

La interleucina 1 existe en dos isoformas, la IL-1α y la IL-1β, ambas surgen a partir de precursores de 33 kDa y sus formas activas son polipéptidos de 17 kDa (Goldsby y col., 2000). Aunque sus secuencias son homólogas en solamente un 30%, se unen al mismo receptor de membrana y ejercen el mismo efecto (Goldsby y col., 2000). La IL-1β es producida por macrófagos, neutrófilos, queratinocitos y células endoteliales (Ravinovitch, 1998), por la acción de la enzima convertidora de IL-1β (Allen y col., 1998) (ICE; IL-1β-converting enzyme). Esta enzima fue la primera de una serie de cisteína proteasas llamadas caspasas (cisteína aspartasas), que se han identificado en los mamíferos.

La IL-1β tiene también la capacidad de inducir insulitis. Las quimiocinas (chemoattractant cytokines) son sustancias liberadas por leucocitos y otros tipos celulares, que tienen la propiedad de estimular y dirigir la migración de leucocitos hacia el área de daño tisular (Baggiolini y col., 1997). La proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-

1) es una quimiocina de la familia C-C (Luster, 1995), que provoca la migración de células mononucleares principalmente monocitos (leucocitos que llegan a ser macrófagos), linfocitos T (CD8+ y CD4+) y células asesinas naturales (Gu y col., 1999), por lo que juega un papel importante en los procesos inflamatorios y su expresión aumenta en sitios de inflamación como ocurre en artritis reumatoide y aterosclerosis. En ratones transgénicos que expresan el MCP-1 bajo el control del promotor de la insulina, se produce insulitis abundante en macrófagos, sin daño a las células β (Grewal y col., 1997). Asimismo, Eizirik y Darville (2001) han demostrado que la administración de IL-1β induce la síntesis del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) del MCP-1 en células β. Ciertamente, esto no es suficiente para ocasionar diabetes en los animales transgénicos, sin embargo, estos estudios demuestran que el MCP-1 puede sintetizarse en respuesta a IL-1β, lo que podría promover la insulitis en el proceso normal de la diabetes. Al NO se le ha señalado como el mediador del daño ocasionado por citocinas como la IL-1β, INF-γ y el TNF-α, mientras que a las poliaminas se les ha reconocido como mediadoras del efecto de numerosos factores que estimulan la hipertrofia e hiperplasia de las células productoras de insulina, como son la glucosa, los factores de crecimiento semejantes a la insulina, prolactina, etc. (Sjöholm y col , 1992, Sjöholm 1993).

L-Arginina.

En la década de los 60s se reportó que el aminoácido L-arginina estimula la liberación de insulina (Floyd y col., 1966; Levin, 1972), resultando más efectivo que otros aminoácidos y notablemente inferior que la glucosa. El óxido nítrico (NO) y las poliaminas son productos del metabolismo de la L-arginina (Moncada y col., 1991; Morgan, 1994) y

son producidos por las células β de los islotes de Langerhans (Sjöholm y col, 1992, Schmidt ycol., 1992, Sjöholm, 1993).

Oxido nítrico.

En 1980 Furchgott y Zawadzky reportaron que las células endoteliales, capa celular más interna de los vasos sanguineos, producen una sustancia que difunde al músculo liso vascular y lo relaja. Dicha sustancia, de la que entonces faltaba determinar su naturaleza química, fue llamada factor relajante derivado del endotelio (EDRF). Salvador Moncada y su grupo (Palmer y col., 1987) demostraron que el EDRF es el óxido nítrico. Este evento disparó la investigación del NO, del que hasta entonces se sabía que es un contaminante, uno de varios óxidos de nitrógeno presentes en el smog y nocivo para la salud.

En condiciones atmosféricas el NO es un gas. La estructura de Lewis para el NO denota que es un radical libre. Los radicales libres son átomos o moléculas con uno o más electrones desapareados, es decir, en un orbital atómico o molecular hay un electrón en lugar de dos. Esto le confiere al NO en sistemas biológicos una alta reactividad con los constituyentes celulares, ocasionando su oxidación, lo que se traduce en inhibición enzimática y rompimiento del ácido desoxiribonucleico (DNA) (Moncada y col., 1991), entre otros efectos. Así, juega un papel importante en la respuesta inmune al ser producido por macrófagos activados y es utilizado, junto con ROS, para destruir microorganismos invasores y células infectadas o tumorales (Krönche y col., 1995). En concentraciones bajas, sin embargo, el NO juega un papel importante en una amplia variedad de funciones, incluyendo la transmisión neuronal, relajación vascular, modulación inmune y citotoxicidad

(Moncada y col., 1991) y ha sido también asociado con la liberación de insulina inducida por glucosa (Harald y col., 1992). Puesto que el NO es un radical libre de vida corta, su regulación ocurre principalmente a nivel de su biosíntesis. En los sistemas biológicos, el NO es sintetizado a partir de la L-arginina por una familia de enzimas conocidas como óxido nítrico sintasas (NOSs), que requieren de FAD, mononucleótido de flavina y adenina (FMN), dinucleótido de nicotinamina y adenina fosfato reducido (NADPH) y tetrahidrobiopterina (Bredt y Snyder, 1994; Knowles y Moncada, 1994).

Se conocen tres NO sintasas, dos de ellas expresadas constitutivamente, la neuronal (NOSn) y la endotelial (NOSe), y una inducible, la de los macrófagos (NOSi o NOSm). Las NOSs constitutivas están presentes en el citoplasma y producen NO en respuesta a un aumento en la concentración de calcio libre citoplásmico $[Ca^{2+}]_i$, mientras que la actividad de la NOSi no depende de un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ y la enzima debe ser sintetizada, lo que ocurre en respuesta a citocinas como la IL-1β y el INF-γ y lipopolisacáridos bacterianos (Knowles y Moncada, 1994; Krönche y col., 1995).

Efectos de la IL-1β sobre las células β

La IL-1β es citotóxica para las células β de la rata, impidiendo la biosíntesis y secreción de insulina y el metabolismo oxidativo en islotes aislados de ratas (Sandler y col., 1987) y la exposición prolongada a dicha citocina da como resultado la destrucción de los islotes (Bendtzen y col., 1986). Se ha demostrado que dicha citocina induce la síntesis de la NOSi en las células β, así como la producción de NO y que la administración de inhibidores de las NOSs son capaces de impedir los efectos de la IL-1β, por lo que existe consenso general de que el NO producido por las células β es un mediador del daño

causado por citocinas como la IL-1β (McDaniel y col., 1997). Asimismo, Stassi y col. (1997) encontraron que en pacientes con diabetes mellitus dependiente de insulina, las células β presentan el receptor Fas de superficie celular, el cual induce a los linfocitos T circundantes a fagocitarlas. Los autores también reportaron que la exposición de dichas células a IL-1β, o la administración de sustancias donadoras de NO, como nitroprusiato de sodio y el (NOC)-18 inducen la expresión del receptor Fas en las células β pancreáticas.

Diabetes experimental inducida por aloxana

La diabetes mellitus tipo 1 se presenta espontáneamente en numerosas y variadas especies (Mordes y Rossini, 1981). En la rata y el ratón, por su clásica utilidad experimental, se han aislado cepas que presentan este tipo de diabetes espontánea, como son el ratón diabético no obeso y la rata biodesarrollada. Estos roedores han resultado de gran interés en la práctica científica y se han emprendido numerosos estudios para desentrañar los mecanismos mediante los que se desarrolla la diabetes.

Por otra parte, existen varias sustancias diabetogénicas que ocasionan daño a las células β pancreáticas, entre las cuales se encuentra la aloxana (2,4,5,6-tetraoxohexahidropirimidina) y sus N- alkil derivados, así como la estreptozotocina, que son selectivamente tóxicos para las células β pancreáticas, dejando intactas tanto a las demás células endocrinas de los islotes, como a las de la región exocrina (Jörns y col., 1997).

La aloxana se disuelve fácilmente en agua y se descompone rápidamente a ácido aloxánico (el cual no es tóxico) tanto en solución acuosa como en el plasma sanguíneo, así como también a pH neutro o básico, mientras que a pH ácido es estable a temperatura

ambiente (Rerup, 1970). En el organismo animal tiene una vida media de solamente 2 minutos, entra a las células de órganos como corazón, hígado, riñón y páncreas y es captada en mayor concentración por las células β que por las demás células tanto de los islotes de Langerhans como aquéllas de la región exocrina. Se cree que el mecanismo de acción de la aloxana es mediante la producción de ROS, como el H_2O_2 y el OH•, los que ocasionan rompimiento del DNA (Malaisse, 1982; Takasu y col., 1991; Okamoto, 1997). En un intento por reparar el DNA dañado se activa la enzima poli (ADP-ribosa) sintetasa, la cual utiliza NAD^+ como substrato, esto ocasiona que la concentración intracelular de NAD^+ disminuya y, como consecuencia, las células no pueden llevar a cabo su función metabólica normal y finalmente mueren (Okamoto, 1997).

Poliaminas

Las poliaminas son un grupo de pequeñas moléculas alifáticas (no cíclicas), policatiónicas cuya característica es poseer dos o más grupos amino en su estructura. Aunque existen en la naturaleza otras moléculas con estas características, tres de ellas han sido las más estudiadas, ya que existe una estrecha relación en su biosíntesis e interconversión en el organismo, además de que se han implicado en numerosos procesos celulares. Estas moléculas son la putrescina ($NH_2(CH_2)_4NH_2$), la espermidina ($NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$) y la espermina ($NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$) (Pegg, 1986; Ackerman y col., 2003).

El descubrimiento de la función de las poliaminas putrescina, espermidina y espermina en la regulación de diversos procesos tales como crecimiento, multiplicación y diferenciación celular, ha despertado gran interés por su estudio en diversas áreas de la

investigación científica. Estas moléculas, a semejanza de los ácidos nucleicos, los aminoácidos y las proteínas, se encuentran distribuidas ampliamente en los sistemas vivos, lo que constituye un indicativo de que su presencia es esencial para la realización de los procesos básicos de la función celular (Seiler, 2003A). El metabolismo de las poliaminas ha sido ampliamente estudiado en bacterias, hongos, levaduras y en células vegetales, así como también en animales. Estas aminas, además de encontrarse en forma de bases alifáticas libres, pueden existir conjugadas con carbohidratos, esteroides, fosfolípidos y péptidos, también como unidades subestructurales dentro de numerosas familias de alcaloides (Pegg, 1986; Seiler, 2003B).

Distribución de poliaminas

Las poliaminas están ampliamente distribuidas en los sistemas biológicos, aunque las concentraciones relativas de putrescina, espermidina y espermina varían notablemente en tipos celulares diferentes (Childs y col., 2003).

En general, los procariontes tienen más altas concentraciones de putrescina que de espermidina y carecen de espermina. Los eucariontes tienen generalmente bajas concentraciones de putrescina y tienen espermidina y espermina.

La putrescina es el precursor de la síntesis de la espermidina y la espermina. En las células animales esta diamina se obtiene de la ornitina, sin embargo, en las células vegetales superiores, bacterias y hongos, la putrescina puede obtenerse a partir de agmatina, que a su vez es producida por la descarboxilación de la arginina (Pegg, 1986, Sjöholm, 1993)

Biosíntesis e interconversión

En los mamíferos, la biosíntesis de poliaminas se lleva a cabo a partir del amino ácido semiesencial L-arginina, a través de su conversión a ornitina, y subsecuentemente a putrescina mediante la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) (Pegg, 1986; Teti y col., 2002).

La ornitina disponible para estas reacciones proviene del plasma, además de que puede formarse dentro de las células, por la acción de la arginasa (Medina y col., 2003). Es posible que esta enzima, ampliamente distribuida en los diferentes tejidos, se presente en tejidos extrahepáticos con objeto de facilitar la disponibilidad de ornitina para la biosíntesis de poliaminas. Por esta razón, se ha pensado que la arginasa puede ser una de las enzimas que regulan la etapa inicial en la biosíntesis de poliaminas, debiendo recordarse que su participación fisiológica tradicionalmente estudiada se relaciona con el ciclo de la urea

La ODC es una enzima que depende para su actividad de fosfato de piridoxal. Se encuentra en niveles bajos en las células en estados fisiológicos de latencia. Su actividad puede elevarse varias veces, como respuesta a diversos estímulos tróficos, tales como hormonas, drogas, regeneración de tejidos y factores de crecimiento (Pegg y col., 1994) Aún así, se ha observado que en el riñón de ratones (órgano en el cual la concentración de ODC se eleva más de 20 veces mediante estimulación con andrógenos), la ODC sólo constituye 0.01% de la proteína citoplásmica total y 0.00012% en el hígado de ratas estimuladas con tioacetamida.

Para convertir a la putrescina en espermidina debe adicionarse un grupo propilamina. Este grupo se deriva de la metionina, la cual primero es convertida en S-adenosilmetionina y luego descarboxilada enzimáticamente por la S-adenosilmetionina

descarboxilasa (SAMD) (Medina y col., 2003). El producto de la descarboxilación, S-adenosilhomocisteamina, se mantiene bajo y constituye el factor limitante en la formación de espermidina.

En esta reacción se produce metiltioadenosina, que se hidroliza por acción de la enzima metiltioadenosina fosforilasa. La adenina que resulta de esta reacción se recupera como nucleósido. La metil tiorribosa-1-fosfato es reconvertida a metionina. Este proceso ocurre a través de una serie de reacciones, todavía no bien caracterizadas, pero que involucran la producción secuencial de 1-fosfato-5-S-metiltioribofuranósido, 1-fosfo-5-S-metiltiorribulosa y 2-ceto-4-S-metiltiobutirato como intermediarios. Las células de mamífero contienen todas las enzimas para la biosíntesis de poliaminas, pero algunas lineas de células tumorales carecen de metiltioadenosina fosforilasa y excretan la metiltioadenosina producida en la biosintesis de poliaminas (Pegg, 1986; Medina y col., 2003).

La SAMD de los mamíferos es activada por putrescina e inhibida por espermidina; esta enzima, que depende del piruvato como cofactor, está presente en los tejidos en muy bajas concentraciones, equivalentes a 0.015 % de la proteína soluble en la próstata ventral y a 0.0007% en el hígado. Su actividad es también regulada por muchas hormonas y por otros estímulos que promueven el crecimiento.

Es importante mencionar que la incorporación de los grupos propilamina para la síntesis de espermidina y espermina se llevan a cabo por la acción de las enzimas espermidina sintasa y espermina sintasa, respectivamente (Ackerman y col., 2003, Medina y col., 2003).

A pesar de la similitud entre estas dos reacciones, cada enzima tiene cierta especificidad por su propio sustrato. Las aminopropiltransferasas están presentes en

diversas células en cantidades mayores que las descarboxilasas. Se ha pensado que son reguladas por la disponibilidad de sus sustratos, particularmente la S-adenosilhomocisteamina. Sin embargo, en el caso de la espermidina sintasa se ha observado que también se eleva en respuesta a hormonas, regeneración tisular y factores de crecimiento celulares (Seiler, 2003).

Por otra parte, se ha demostrado que las reacciones catalizadas por las dos sintasas son irreversibles, y que la conversión de la espermina en espermidina y de la espermidina en putrescina ocurre *in vivo*. Esta interconversión tiene lugar por la acción de las enzimas espermidina-N^1-acetiltransferasa y propilamina oxidasa.

La primera enzima utiliza acetil-CoA para convertir a la espermidina en N^1-acetilespermidina y también acetila espermina, formando N^1-acetilespermina. Estos derivados acetilados son buenos sustratos para la poliamina oxidasa, que los utiliza de manera eficiente, hidrolizando a nivel del hidrógeno interno para dar N^1-acetilpropionaldehído y putrescina o espermidina, en función del sustrato. En virtud de que en condiciones fisiológicas los derivados acetilados son metabolizados rápidamente, se ha propuesto que la acetilación es el paso limitante de esta interconversión y se ha demostrado que la espermidina-N^1-acetiltransferasa es inducida rápidamente y se incrementa marcadamente después de la exposición a agentes tóxicos, que resaltan la conversión de espermidina en putrescina y de espermina en espermidina.

En los tejidos de la rata se encuentran solamente pequeñas cantidades de los derivados acetilados, aún en el pico de inducción, ya que la actividad de la poliamina oxidasa es mayor.

En el ratón pueden encontrarse grandes cantidades de N^1-acetilespermidina y de N^1-acetilespermina, ya que los tejidos de este animal tienen niveles veinte veces más bajos de

poliamina oxidasa. Sin embargo, aún en esta especie, los derivados acetilados son degradados en unas cuantas horas.

Por otra parte, la putrescina puede ser oxidada por la diamina oxidasa, produciendo γ-aminobutiraldehído en lugar de convertirse a espermidina; este aldehído puede posteriormente ser oxidado a γ-aminobutirato (GABA), o dar origen a compuestos cíclicos (Thomas y Thomas, 2003). Pero la putrescina puede también ser acetilada por una enzima microsomal y la monoacetilputrescina ser oxidada por una monoamina oxidasa, para producir GABA, lo que podría ocurrir en tejidos como el cerebro, que tienen baja actividad de diamina oxidasa.

La acetilación de las poliaminas puede llevarse a cabo también por una enzima nuclear que, con espermidina como sustrato, forma preferentemente N^8-acetil espermidina.

Las poliaminas acetiladas han sido encontradas en sangre y orina, pero en cantidades pequeñas y no es clara la importancia de la acetilación que permite la excreción de las poliaminas (Wallace y col., 2003).

Poliaminas y diabetes experimental

Existe abundante evidencia que indica que las poliaminas juegan un papel importante en la división celular en muy diversos tejidos y que son constituyentes celulares esenciales en el crecimiento normal (Pegg, 1986, 1988; Marton y Pegg, 1995). La actividad de las enzimas que participan en su biosíntesis aumenta durante las fases G1 y S del ciclo celular, de manera que la concentración de poliaminas se encuentra elevada al inicio de la mitosis (Sjöholm, 1993).

Recientemente Jurkowska y col. (1997) reportaron que en ratas a las que se les indujo pancreatitis mediante cerulina, la administración de un inhibidor de la ODC disminuyó el índice de regeneración de los acinos pancreáticos. Además, en islotes de Langerhans aislados de ratas fetales cultivados *in vitro* y expuestos a glucosa, hormona del crecimiento o factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) más factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-I), se observa un aumento significativo en la división de las células β, lo que se correlacionó con un aumento en la concentración de poliaminas (Sjöholm y col., 1990). El efecto de la L-arginina ha sido estudiado en el páncreas de ratas diabéticas, en las que su administración causa un aumento en la concentración de putrescina, que se ha asociado con la recuperación de la función pancreática (Méndez y Arreola, 1992). Se ha observado también que la administración de L-arginina causa una disminución en los niveles de glucosa sanguinea y hay una clara tendencia a la normalización del perfil de lípidos en ratas tratadas con aloxana y en menor tiempo en ratas tratadas con L-arginina (Méndez y Balderas, 2001). Por estas razones, consideramos importante estudiar el efecto de estas sustancias en la regeneración de las células β pancreáticas.

En estudios conducidos en este laboratorio se ha observado que en ratas Sprague-Dawley tratadas con aloxana (120 mg/peso corporal) los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol se elevan y revierten totalmente en un lapso de doce días. Otros parámetros bioquímicos que se utilizaron fueron las concentraciones séricas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y Apo B-100, cuyos niveles aumentan en pocas horas después del tratamiento con aloxana, mientras que la lipoproteína de alta densidad (HDL) y la Apo A-I disminuyen (Méndez y Balderas, 2001).

Regeneración de células β

Es importante mencionar que las células de diferentes tejidos pueden depender de sustancias diferentes que estimulen el proceso de división celular, por lo que una sustancia que es mitógena en un tejido, puede no tener el mismo efecto en otro. Por ejemplo, el factor de crecimiento neural estimula la división del tejido nervioso, mientras que el epitelio uterino responde a los efectos mitogénicos de los estrógenos y los mitógenos clásicos de los fibroblastos son el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante α (TGF-α) o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas. En islotes cultivados *in vitro* y en estudios *in vivo* llevados a cabo en animales, se ha encontrado que varias sustancias exógenas actúan en las células β estimulando su división, mientras que otras se elevan dentro de las células y dicho aumento es esencial para ello (Bonner-Weir, 1994; Bonner-Weir y Smith, 1994). Estas sustancias son la glucosa, aminoácidos, poliaminas y proteína reg, entre otras (Okamoto, 1997; Sjöholm, 1993, 1996, 1997), así como también la participación de sustancias que inhiben la replicación de las células β como la pancreastatina, la proteína inhibidora del diazepam, la ciclosporina A y la interleucina 1β.

Neogénesis

Durante el desarrollo embrionario y después de que el páncreas se ha formado a partir de dos evaginaciones del intestino anterior, los islotes de Langerhans se desarrollan a partir del epitelio de pequeños conductos (Pictet y Rutter, 1972; Rosenberg, 1998) y de novo a partir del mesénquima pancreático (Debas, 1997). Parece ser que después de las primeras semanas posteriores al nacimiento, en los mamíferos en condiciones normales ya

no existe formación de nuevos islotes. Sin embargo, en estudios llevados a cabo *in vivo* en animales adultos, se ha demostrado mediante microscopía de luz y electrónica que la recuperación de la función pancreática se debe, en algunos modelos de experimentación, no solamente a la división de las células β residuales o preexistentes, sino también a la formación de nuevos islotes (Logothetopoulos, 1972; Gu y Sarvetnik, 1993) a partir de conductos pancreáticos a través del proceso de neogénesis, evento durante el cual, células del epitelio ductal se dividen y se diferencian a células endocrinas de los islotes (Rosenberg, 1998). Un modelo en el que ocurre neogénesis, desarrollado en el criceto por Rosemberg y Vinik en 1992, consiste en envolver la cabeza del páncreas con cinta de celofán, en este caso ocurre obstrucción parcial de los conductos y formación de nuevos islotes a partir de ellos. Otro ejemplo es el modelo desarrollado en el ratón por Nora Sarvetnick y su grupo en 1993 (Gu y Sarvetnik, 1993), en cuyo caso, ratones transgénicos expresan el INF-γ en las células β, lo cual desencadena una serie de procesos que incluye la infiltración de linfocitos en los islotes, la destrucción de las células productoras de insulina y la formación de islotes nuevos a partir de los conductos pancreáticos. Cabe mencionar que en pacientes con diabetes tipo 1 ó 2 no se han encontrado indicios de neogénesis.

En la formación de islotes de Langerhans durante el desarrollo embrionario participan varios genes. De ellos, los más estudiados han sido el Pax 4, Pax 6, Pdx 1, islote 1 (isl-1) y el factor nuclear de hepatocitos-3β (Sander y Germans, 1997). Se ha demostrado que el Pax 4 es indispensable para que las células β y δ se diferencien a partir de células precursoras y que cuando se inactiva dicho gene, las células β y δ no se observan en los islotes y hay un aumento en el número de células α (Sosa-Pineda y col., 1997). Por otra parte, en la neogénesis de islotes en el ratón transgénico que expresa INF-γ, se ha

demostrado mediante técnicas inmunohistoquimicas que los productos de la expresión de dichos genes están presentes en las células que darán origen a las células endocrinas de los nuevos islotes (Kritzik y col., 2000). Asimismo, trabajando con el modelo de obstrucción parcial de conductos pancreáticos, Rosenberg (1998) aisló una sustancia de origen proteínico de los conductos en diferenciación, a la que han llamado ilotropina, cuya administración a cricetos con diabetes experimental ha revertido el estado diabético hasta en 60% de los animales, comparado con 10% del grupo control.

Evaluación de la proliferación celular

Existen varias formas de evaluar la proliferación celular, desde el registro de la diferencia en peso del órgano o tejido, hasta el uso de anticuerpos. El registro del peso del órgano como índice de proliferación celular puede conducir a errores, puesto que la ganancia en peso puede deberse a la entrada de líquido o a la infiltración de otras células, como ocurre en la inflamación (Defazio y col., 1987). Por razones similares, la medición de la cantidad de DNA, como factor representativo de proliferación celular puede no ser tan exacto como se desea, de manera que resulte más conveniente evaluar la síntesis del DNA o el índice mitósico. El índice mitósico se determina contando 1000 células y de éstas, las que están en división . El número de células que se encuentran replicándose se divide entre 1000 y se multiplica por 100, con lo que se obtiene el porcentaje de células que están en división. Es común evaluar la proliferación celular mediante la administración de colchicina, en cuyo caso se cuentan las figuras mitósicas detenidas en la metafase del ciclo celular También se ha utilizado la administración de timidina tritiada (^{3}H-timidina), evaluándose mediante autoradiografía. Actualmente se prefiere el uso de 5-bromo-2'-

desoxiuridina (BrdU) (Davidson y col., 1989; Defazio y col., 1987; Iatropoulos y Williams 1996). Esta sustancia, al igual que la ^{3}H- timidina, se incorpora al material genético en la fase S del ciclo celular, y a diferencia de la ^{3}H-timidina, puede hacerse evidente mediante el empleo de un anticuerpo contra la sustancia, además de que el investigador no se expone a radiación y la técnica es más rápida (Iatropoulos y Williams, 1996).

Modelos experimentales para estudiar la regeneración pancreática

Aún cuando el índice de regeneración de las células productoras de insulina es de solamente 3% por día, éste ha podido ser aumentado considerablemente utilizando modelos experimentales. La disminución en el número de células β es una estrategia que ha permitido comprender algunos factores que intervienen en su regeneración. Entre los procedimientos más comunes para disminuir el número de células β están: a) pancreatectomía subtotal (Tanigawa y col., 1997), en la que se retira un 90% del páncreas y se genera un estado diabético en los animales intervenidos; b) pancreatectomía parcial (Hardikar y col., 1999), en la cual entre un 50% a un 60% del tejido pancreático es extirpado, y tiene la ventaja sobre la anterior de que no se presenta un estado diabético, por lo que no hay hiperglucemia, lo que permite estudiar el proceso de regeneración en condiciones más semejantes a la normal; c) administración de sustancias que destruyen las células pancreáticas selectivamente, como la aloxana (Davidson y col., 1989) y la estreptozotocina (Hardikar y col., 1989); d) destrucción inmune en animales transgénicos cuyas células β producen el interferón γ (Gu y Sarvetnik, 1993). En estos casos, ocurre formación de nuevas células β productoras de insulina.

Por otra parte, en estudios *in vitro* se cultivan islotes en condiciones apropiadas, teniéndose la ventaja de que no hay interacción con otros tipos celulares externos a los islotes. En este modelo de investigación se ha preferido el uso de islotes fetales, en los cuales hasta un 95% de las células presentes son células β, y la división celular que se observa es mayor que en islotes aislados de animales adultos (Sjöholm, 1997). En algunos trabajos (Otonkoski y col., 1994) se han utilizado también islotes de humano. Asimismo, las líneas celulares han arrojado resultados importantes no solamente en el estudio de la regeneración, sino también en múltiples aspectos de la regulación del metabolismo de las células β (Tanabe y col., 1997).

Planteamiento del problema

Recientemente fue publicado por este laboratorio que las ratas Sprague-Dawley tratadas con una dosis de aloxana subumbral para inducir diabetes, recuperan su función endocrina pancreática espontaneamente (Méndez y Balderas, 2001) en un plazo corto de doce días. Este constituye un modelo en que el efecto tóxico de la aloxana no es muy fuerte y permite la recuperación del mecanismo que regula la glucemia. Es importante determinar si esta recuperación de la función endocrina es el resultado de un aumento en la regeneración de células β intrainsulares preexistentes y/o neogénesis. Asimismo, es importante determinar si el tratamiento con L-arginina o sustancias derivadas de ésta, como son las poliaminas, son capaces de acelerar estos procesos, favoreciendo la recuperación más rápida de la población celular productora de insulina en ratas tratadas con aloxana.

Justificación

Debido a que la diabetes tipo I es un síndrome que se presenta cada vez con más frecuencia en el ser humano y que el único tratamiento farmacológico, fuera de los cuadros de investigación es la administración de insulina, es urgente encontrar alternativas de tratamiento y una posible cura. Es importante, por lo tanto, continuar la búsqueda de sustancias que favorezcan el restablecimiento de la población de células β en situaciones en donde la población pancreática de éstas está reducida, tal como en la diabetes mellitus. A este respecto, la arginina y las poliaminas podrían favorecer la formación de nuevas células β, ya que en ellas se ha demostrado la participación de estas sustancias en el proceso de replicación (Smith, 1992; Sjöholm, 1992, 1993).

Si la L-arginina o las poliaminas estimulan la regeneración de las células β pancreáticas, podrían utilizarse con fines terapéuticos, lo que ofrecería nuevas opciones de tratamiento para los pacientes diabéticos, considerando además, que son compuestos no tóxicos, que pueden ser utilizados a dosis relativamene altas.

Hipótesis

La recuperación del daño inducido por la aloxana en condiciones que alteran el control de la glucemia depende del aumento en la proliferación de las células β y en su neoformación a partir de células ductales.

La L-arginina y las poliaminas promueven la división de las células β de los islotes pancreáticos en las ratas tratadas con aloxana, facilitando así su regeneración y neogénesis, así como la normalización de la glucemia, trigliceridemia y colesterolemia.

Objetivo general

Estudiar la participación de la proliferación de las células β y de su neogénesis a partir de otros tipos celulares en la recuperación de la función pancreática después del daño inducido por aloxana y si estos procesos son estimulados por la administración de L-arginina y poliaminas.

Objetivos particulares

a) Determinar en qué grado los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol se alteran después de una inyección de aloxana (dosis subdiabetogénica).

b) Determinar si la alteración producida en la glucemia, trigliceridemia y colesterolemia de ratas tratadas con aloxana se correlaciona con el índice de incorporación de BrdU por las células β.

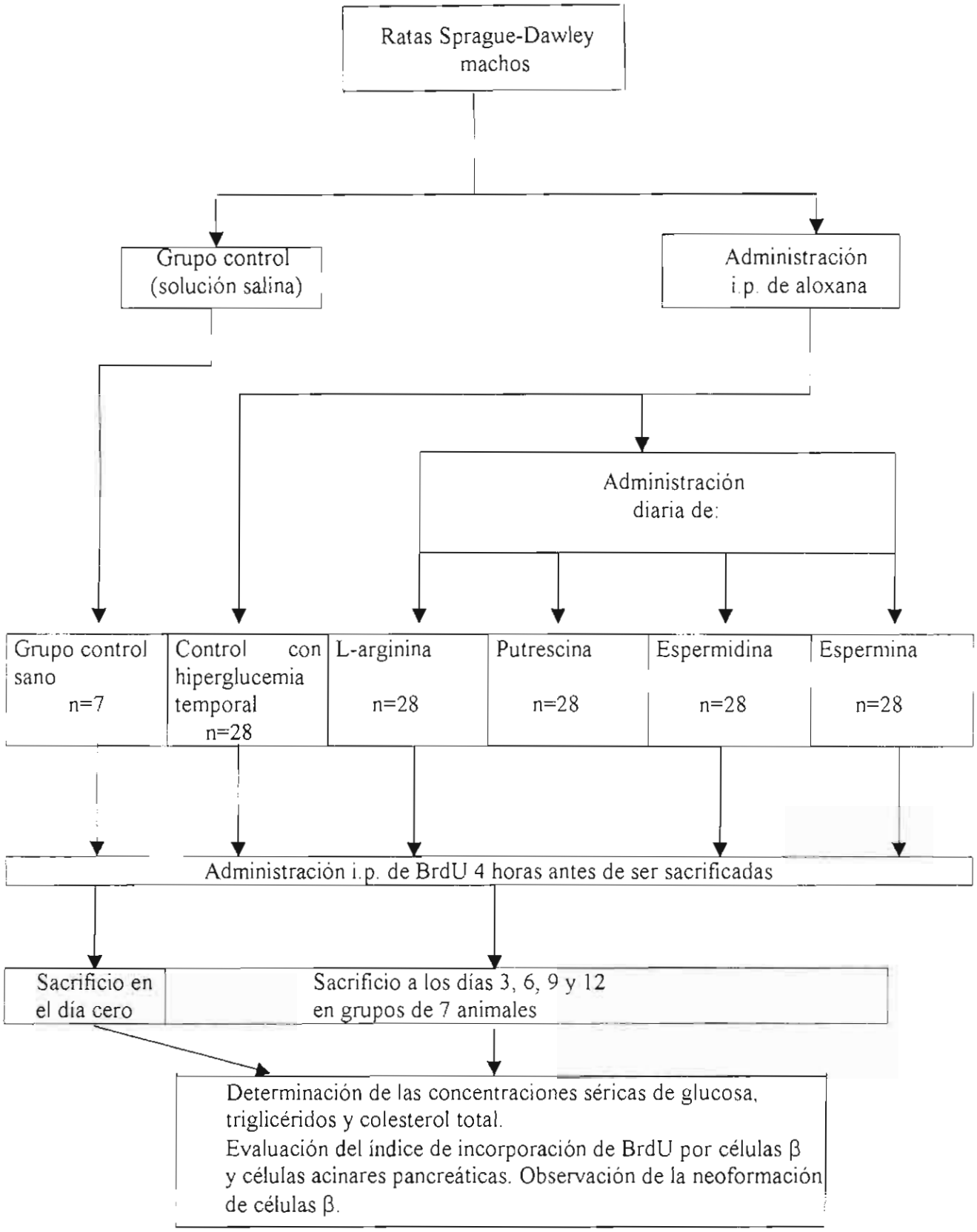
c) Determinar sí la alteración temporal producida en los parámetros bioquimicos de ratas tratadas con aloxana puede corregirse con la administración de arginina y poliaminas, mediante la promoción de la división de las células β pancreáticas en ratas tratadas con aloxana.

Modelo Experimental

Se utilizaron 147 ratas Sprague-Dawley, machos, de 300 ± 10 g de peso. Un grupo de siete ratas no recibió tratamiento alguno (grupo control sano). Al resto de los animales se les indujo hiperglucemia temporal mediante la administración de aloxana. Se mantuvieron bajo un fotoperiodo de luz y oscuridad de 12 horas (la luz se prendió diariamente a las 06:00 horas) y suplementadas con agua y alimento *ad libitum*. Un grupo control de 28 ratas recibió solamente aloxana al inicio del experimento (control con hiperglucemia temporal). Los otros grupos, con 28 ratas cada uno, recibieron, además de aloxana en dosis única, L-arginina, putrescina, espermidina o espermina diariamente durante 3, 6, 9 ó 12 dias (Esquema 1)

Inducción de hiperglucemia

A 140 ratas se les administró 120 mg de aloxana/kg de peso corporal por vía intraperitoneal en una sola ocasión. La aloxana se preparó disolviendo 0.5 g de aloxana en 2.5 ml de NaCl 0.154 M. A tal concentración, una rata de 300 g de peso recibió 180 µl de la solución preparada. Las ratas se distribuyeron al azar en 21 grupos de 7 animales cada uno, se alojaron por separado y se registró su peso corporal diariamente (Esquema 1).



Esquema 1. Diseño experimental.

Administración de L-arginina y poliaminas

La L-arginina se preparó a una concentración de 10 mM y las poliaminas putrescina, espermidina y espermina fueron preparadas a una concentración de 10 μM, puesto que estas concentraciones han resultado efectivas en estudios previos conducidos en este laboratorio (Corona de la Peña y col., 2000). Todas las sustancias se administraron diariamente en un volumen de 1 ml por vía intraperitoneal entre las 8 y 9 de la mañana, iniciando inmediatamente después de la aloxana.

Evaluación inmunohistoquímica y determinación de la glucemia, trigliceridemia y colesterolemia

Considerando que la deficiencia en la producción de insulina ocasiona una serie de trastornos metabólicos, como es la hiperglucemia, se evaluaron las concentraciones de glucosa, colesterol total y triglicéridos séricos tanto en el grupo control sano como en los animales con hiperglucemia temporal. En estos últimos, las determinaciones se hicieron después de la administración de aloxana, entre 8 y 9 A.M., cada 72 horas, por 12 días, mediante procedimientos ampliamente utilizados en estudios previos (Méndez y Arreola, 1992, Méndez y Balderas, 2001). Brevemente, estos procedimientos se llevaron a cabo de la siguiente manera:

En los días 0 (grupo control sano), 3, 6, 9 y 12 de tratamiento (grupo control con hiperglucemia temporal y grupos experimentales), las ratas fueron anestesiadas con 0.6 ml de una solución de ketamina 50 mg/ml (Ketalar) por vía intramuscular y 0.3 ml de una solución de xilacina 20 mg/ml (Rompun) por la misma vía; se extrajo sangre de la aorta abdominal y se retiró el páncreas, el cual se fijó en formalina al 10% para llevar a cabo la

técnica inmunohistoquímica, que se realizó en el Departamento de Patología Anatómica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Glucemia. Se determinó por el método de Trinder (1969), el cual consiste en la oxidación de la glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno por la glucosa oxidasa, con la subsiguiente cuantificación del peróxido de hidrógeno liberado, usando 4-aminofenazona y fenol, que por medio de la fenol oxidasa produce un complejo colorido que absorbe a 540 nm. La concentración de este complejo es directamente proporcional a la concentración de glucosa.

Trigliceridemia. Se midieron mediante el método de Wahlefeld (1974). Este método se basa en la hidrólisis de triglicéridos por la lipasa, y el glicerol liberado es utilizado por la glicerol cinasa y la fosfoglicerol oxidasa para formar peróxido de hidrógeno, el cual reacciona con 4-aminofenazona y 4 clorofenol, produciendo un complejo colorido que se mide a 620 nm.

Colesteroemia. Fue medido enzimáticamente, utilizando la colesterol oxidasa (Siedel y col., 1983). La concentración de colesterol total es proporcional al producto colorido formado por la reacción del peróxido de hidrógeno formado con la aminofenazona y el reactivo de fenol y se midió la absorbancia a 540 nm.

Técnica inmunohistoquímica

Se evaluaron también la regeneración de las células β intrainsulares y neogénesis mediante la técnica inmunohistoquímica de doble marcaje (Davidson y col., 1989; Gu y Sarvetnik, 1993) A continuación se describe brevemente esta técnica y una descripción más completa aparece en los apéndices A y B.

Para identificar las células que se encuentran en la fase S del ciclo celular, a los animales de todos los grupos se les administró i.p. una dosis única de 50 mg/kg de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU), disuelta en solución salina 0.154 M (Defazio y col., 1987; Gu y Sarvetnik, 1993), a las 05:00 horas ± 5 minutos y se sacrificaron entre las 09:00 y las 09:30 horas

Se extrajo el páncreas y se colocó en formaldehído amortiguado al 10% durante 2 horas, se deshidrató en soluciones con concentraciones decrecientes de etanol, se incluyó en parafina colocando el órgano en las unidades de inclusión de manera que todo el órgano estuviera representado (cabeza, cuerpo y cola) y se hicieron cortes de 4 ó 5 μm con un microtomo (apéndice A), colocándolos en portaobjetos.

La técnica inmunohistoquímica se llevó a cabo en una cámara húmeda, se aplicó el anticuerpo primario contra BrdU (anticuerpo monoclonal de ratón; dilución 1:100), después se adicionó el anticuerpo secundario biotinilado contra el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de cabra contra ratón; dilución 1:50), se agregó el complejo estreptavidina peroxidasa y se reveló la presencia de BrdU con diaminobenzidina. Para detectar la presencia de insulina citosólica se aplicó el anticuerpo primario contra insulina (anticuerpo policlonal de cobayo; dilución 1:50) y el anticuerpo secundario biotinilado contra el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de conejo contra cobayo; dilución 1:50) se adicionó el complejo estreptavidina peroxidasa y se reveló la presencia de insulina con Nueva Fuchsina. Para mayor detalle, ver el apéndice B.

Determinación del índice de incorporación de BrdU

El índice de incorporación de BrdU por células β intrainsulares y células acinares se determinó contando por lo menos 1000 células y calculando el porcentaje de células que lo incorporaron. Este es similar al índice mitósico, sólo que se reporta como índice de incorporación de BrdU y no como índice mitósico, porque lo que se cuenta no son células en mitosis, sino células que llevan a cabo la incorporación nuclear de BrdU, lo que ocurre en la fase S del ciclo celular. Las células se seleccionaron al azar, orbervando cabeza, cuerpo y cola del páncreas con aumento de 40X.

El conteo de células que incorporaron BrdU se efectuó en cortes separados por 10 cortes, empleando campos distribuidos al azar en cortes en que estuvieron representadas cabeza, cuerpo y cola del páncreas. Se contaron por lo menos 1000 células por cada tipo celular de cada animal.

Análisis estadístico

Las medias de los datos obtenidos en cada grupo se analizaron estadisticamente mediante la prueba de ANOVA (análisis de varianza) para un diseño experimental con dos factores mediante el programa SPSS para Windows. La técnica estadística de ANOVA permite la comparación entre medias y sus respectivas desviaciones estándar e indica si hay o no diferencia entre ellas. En cada uno de los casos nos interesó comparar las medias de la incorporación de BrdU ya sea por las células β intrainsulares o por las células acinares, o bien los parámetros bioquímicos evaluados en el mismo día, para lo cual, después de determinar la existencia de diferencias entre grupos mediante la ANOVA, se realizó la prueba post. hoc de Tukey. Los valores se consideraron estadísticamente significativos a $p < 0.05$.

AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN SERVICIOS DE INFORMACIÓN
ARCHIVO HISTÓRICO

RESULTADOS

Peso corporal y parámetros bioquímicos

Se midieron el peso corporal, glucosa, triglicéridos y colesterol total séricos a los 3, 6, 9 y 12 días en ratas hiperglucémicas sin tratamiento y ratas hiperglucémicas tratadas con L-arginina, putrescina, espermidina o espermina. Hubo una pérdida significativa en el peso corporal final de ratas con hiperglucemia temporal sin tatamiento con respecto al grupo control sano ($p < 0.05$). Los pesos inicial y final fueron de 303.1 ± 12 8 contra 344 5 ± 17.8 y 303.7 ± 13.2 contra 289.2 ± 21.4 g (media ± D.E.) para los grupos control sano y grupo control con hiperglucemia temporal, respectivamente. No se observaron diferencias significaivas en el peso entre las ratas con hiperglucemia temporal tratadas con L-arginina o poliaminas y el grupo control sano, pero si con el tratado únicamente con aloxana. Las concentraciones séricas de glucosa, triglicéridos y colesterol total para los grupos control normal e hiperglucémico se muestran en las Tablas 1-3. El tratamiento con aloxana indujo la elevación transitoria en la glucosa, trigliceridos y colesterol séricos, encontrandose sus valores máximos al día tres postratamiento. Posteriormente, sus valores regresaron a aquéllos del grupo control normal entre los nueve y doce días después de la administración de aloxana. La concentración de glucosa sérica fue de 128.6 ± 6.4 mg/dl en el grupo control sano, mientras que ésta fue de 542.4 ± 63.1 mg/dl en el día 3 en el grupo tratado con aloxana ($p < 0.05$) y posteriormente disminuyó, regresando a valores normales en el día 12. La concentración de triglicéridos y colesterol séricos mostraron un patrón similar a la glucosa, alcanzando niveles de 907.6 ± 154.9 y 106.0 ± 11.4 mg/dl (media ± D. E.), respectivamente, en el día 3 y disminuyendo de ahí en adelante (Tablas 2 y 3). En estos dos parámetros se regresó a los valores normales en el día nueve.

Tabla 1 Glucemia (mg/dl) en ratas con hiperglucemia temporal tratadas con L-arginina, putrescina, espermidina o espermina.

Tiempo (en días)	(Control con hiperglucemia temporal)	L-arginina	Putrescina	Espermidina	Espermina
0 (Control sano)	128.6 ± 6.4				
3	542 ± 63.1♠	235.2 ± 13.6*	347.9 ± 25.4*	355.2 ± 27.4*	199.2 ± 14.5 *
6	247.5 ± 12.8♠	174.1 ± 9.4*	221. 2 ± 22.8	221.8 ± 24.1	147.3 ± 16.9*
9	154.7 ± 11.5♠	157.9 ± 14.2	144. 3 ± 13.7	140.9 ± 12.3	137.4 ± 5.5
12	136.0 ± 7.8	134.1 ± 8.6	131.5 ± 9.7	137.4 ± 10.5	129.6 ± 5.7

Cada valor es la media ± D.E. de siete determinaciones.
♠Diferencias significativas a $p< 0.05$ comparado con el grupo control sano.
*Diferencias significativas a $p< 0.05$ comparado con el grupo control con hiperglucemia temporal.

Tabla 2. Trigliceridemia (mg/dl) en ratas con hiperglucemia temporal tratadas con L-arginina, putrescina, espermidina o espermina.

Tiempo (en días)	(Control con hiperglucemia temporal)	L-arginina	Putrescina	Espermidina	Espermina
0 (Control sano)	65.3 ± 7.5				
3	907.6 ± 154.9♠	102.2 ± 9.3*	155.4 ± 17.4*	168.9 ± 18.3*	88.1 ± 8.3*
6	234.4 ± 9.0♠	90.7 ± 8.8*	136.3 ± 14.7*	142.1 ± 16.8*	80.7 ± 8.1*
9	77.4 ± 3.9	74.9 ± 8.2	71.8 ± 9.5	72.5 ± 8.2	70.1 ± 7.5
12	68.1 ± 5.1	74.2 ± 8.7	67.9 ± 9.3	67.4 ± 7.9	65.4 ± 6.6

Cada valor es la media ± D.E. de siete determinaciones.

♠Diferencias significativas a $p < 0.05$ comparado con el grupo control sano
*Diferencias significativas a $p<0.05$ comparado con el grupo control con hiperglucemia temporal.

Tabla 3. Colesterolemia (mg/dl) en ratas con hiperglucemia temporal tratadas con L-arginina, putrescina, espermidina o espermina.

Tiempo (en dias)	(Control con hiperglucemia temporal)	L-arginina	Putrescina	Espermidina	Espermina
0 (Control sano)	65.4 ± 6.3				
3	106.0 ± 11.4♠	70.8 ± 5.4*	74.7 ± 7.1*	71.4 ± 7.5*	68.7 ± 6.8*
6	95.1 ± 5.8♠	73.3 ± 6.1*	71.3 ± 7.3*	70.9 ± 7.4*	69.3 ± 6.9*
9	68.7 ± 3.2	69.7 ± 5.2	68.1 ± 6.5	65.9 ± 4.2	64.7 ± 6 1
12	69.7 ± 4.5	66.4 ± 4.9	68.4 ± 7.3	66.5 ± 4.9	64.9 ± 5 3

Cada valor es la media ± D.E. de siete determinaciones.

♠Diferencias significativas a $p < 0.05$ comparado con el grupo control sano
*Diferencias significativas a $p < 0.05$ comparado con el grupo control con hiperglucemia temporal.

El tratamiento con L-arginina y poliaminas, en general, impidió la elevación drástica de los niveles de glucosa en el dia tres de tratamiento (Tabla 1) siendo dicha acción estadísticamente significativa con respecto al grupo control con hiperglucemia temporal ($p < 0.05$) El mismo comportamiento se observa con triglicéridos (Tabla 2) y colesterol total (Tabla 3). Los valores que más tienden a la normalidad son aquéllos obtenidos con espermina, aunque la arginina fue más eficiente que la putrescina y espermidina en evitar la elevación transitoria en estos parámetros bioquímicos.

Cambios histológicos inducidos por la aloxana

La aplicación de la técnica imnumohistoquímica en el páncreas de animales sanos mostró células β normales teñidas para insulina (Figura 1a), mientras que tes días después de la administración de aloxana se encontraron cambios degenerativos en los islotes de Langerhans, que indican la acción tóxica de éste compuesto. Las céluas β se encuentran dispersas y se localizan zonas en que estas son sustituidas por tejido conectivo y posiblemente infiltrados por linfocitos (Figura 1b). En estos animales se observa una regresión progresiva del daño durante los siguientes días y para el día doce la morfología de los islotes de ratas tratadas con aloxana es casi similar a la de islotes de ratas sanas

Cambios regenerativos

Simultaneamente a la degeneración de los islotes de Langerhans aparecen diversos cambios histológicos que llevan al aumento o recuperación de la población de células β. Primero se discutirán los cambios morfológicos y posteriormente el análisis cuantitativo de las células β y células acinares.

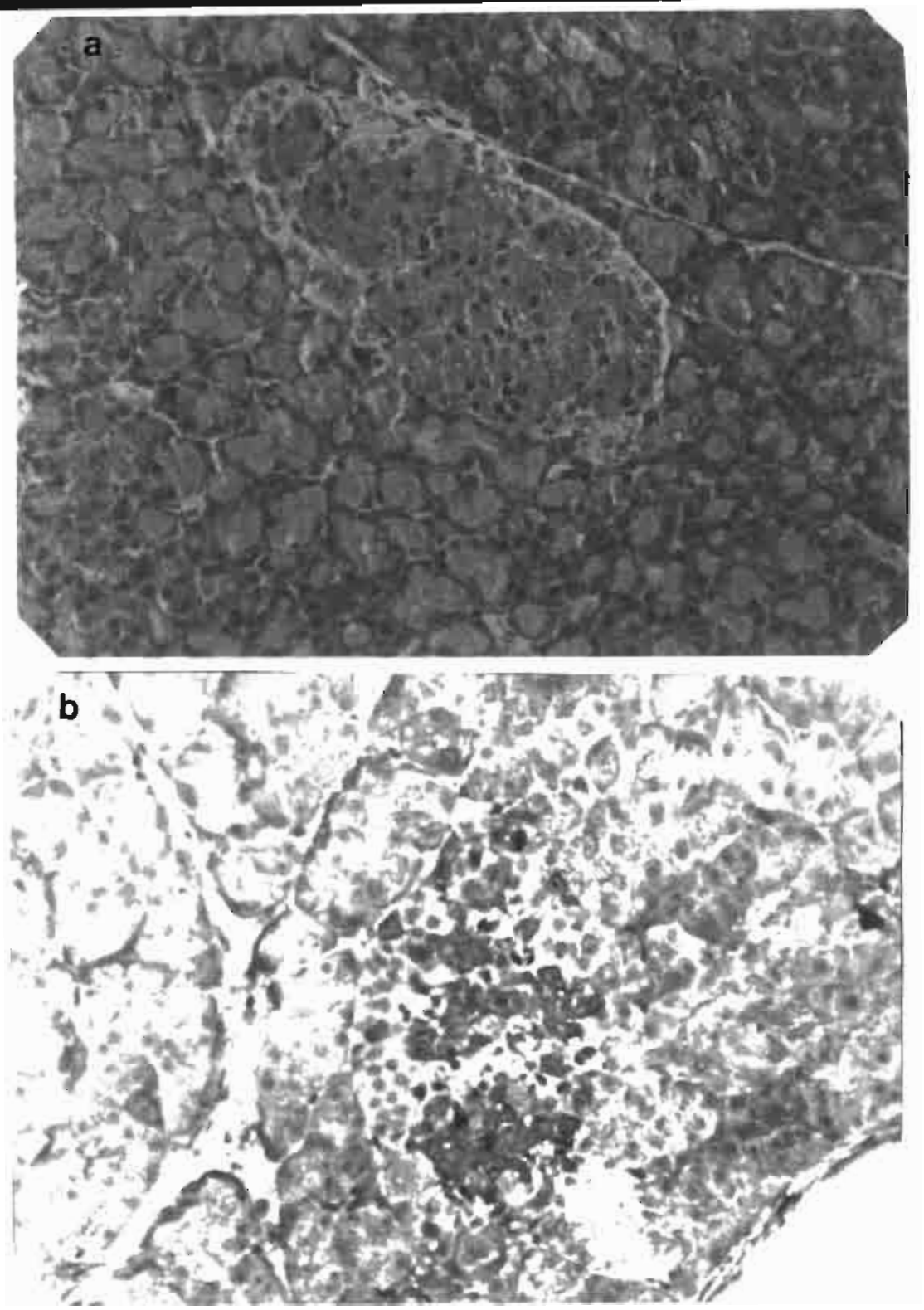


Figura 1 Alteración de la morfología del islote de Langerhans inducida por aloxana. a) Islote de una rata normal. b) Islote de una rata hiperglucémica 72 horas después de la administración de aloxana (120 mg/kg, i.p.) En esta figura se aprecia un número reducido de células β. La insulina y la BrdU fueron detectados mediante la técnica inmonohistoquímica de doble tinción con nueva fuchsina y diaminobencidina, respectivamente (20X).

Neogénesis de células β a partir de células ductales

Aunque en varios animales observamos la proliferación de células ductales o la presencia de insulina en éstas, como ocurrió en ratas con hiperglucemia temporal tratadas con putrescina en el dia doce (Figura 2), con espermidina en el dia tres y con espermina en los dias tres y nueve, fue en un animal del grupo control con hiperglucemia temporal, en el dia tres, donde observamos imagenes que muestran claramente el proceso completo de la neogénesis de células β a partir de células ductales, es decir, replicación y presencia citoplásmica de insulina en células ductales, separación de éstas fuera del conducto y su agregación, lo que se interpreta como parte del proceso por el que ocurre la formación de nuevos islotes (Figura 3). También se observó una región focal, estructura que puede dar origen a numerosos islotes, en una rata en el día seis posterior a la administración de aloxana, (Gu y Sarvetnik,1993) (Figura 4). La región focal presentó un número aumentado de conductos, una característica propia de dicha estructura, así como también un número aumentado de células ductales teñidas para BrdU y un islote completo bien formado, característica que comparten las regiones focales. No se encontró ninguna otra región focal en ninguna otra rata en este estudio

Neogénesis de células β a partir de células acinares

En este estudio se observaron células β fuera de los islotes pancreáticos, las que en adelante se denominarán células β extrainsulares. Estas comúnmente no se encuentran cerca de conductos y parecen surgir por transdiferenciación de células acinares. La posibilidad de que sean parte de islotes pancreáticos es poco probable dada su distribución

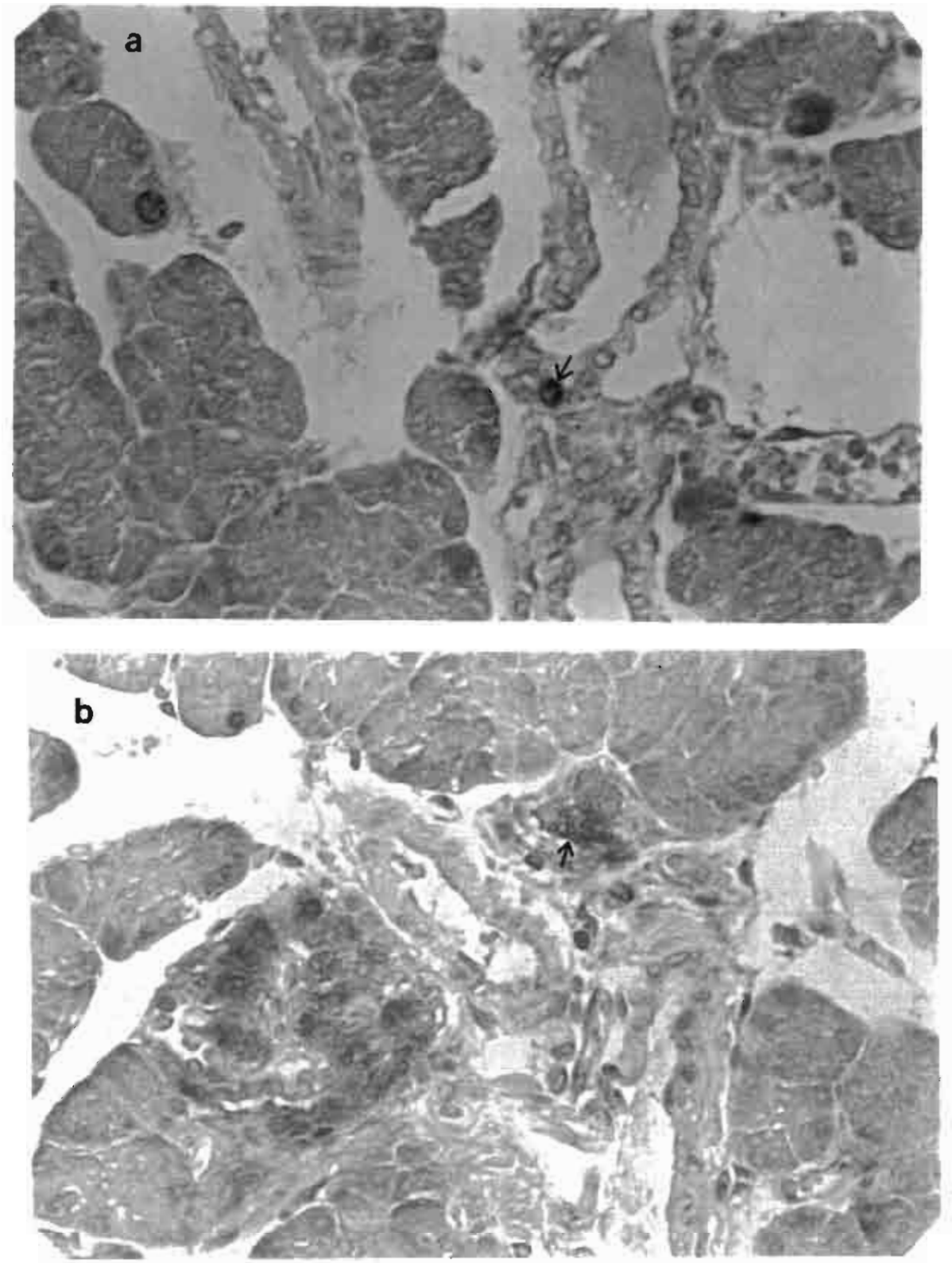


Figura 2. Efecto de putrescina sobre la incorporación de BrdU y expresión de insulina por células ductales. a) Se aprecia una célula ductal que incorpora BrdU (flecha, 40X) b) Células ductales que expresan insulina (flecha, 40X) Ambas preparaciones corresponden al día doce de tratamiento con putrescina

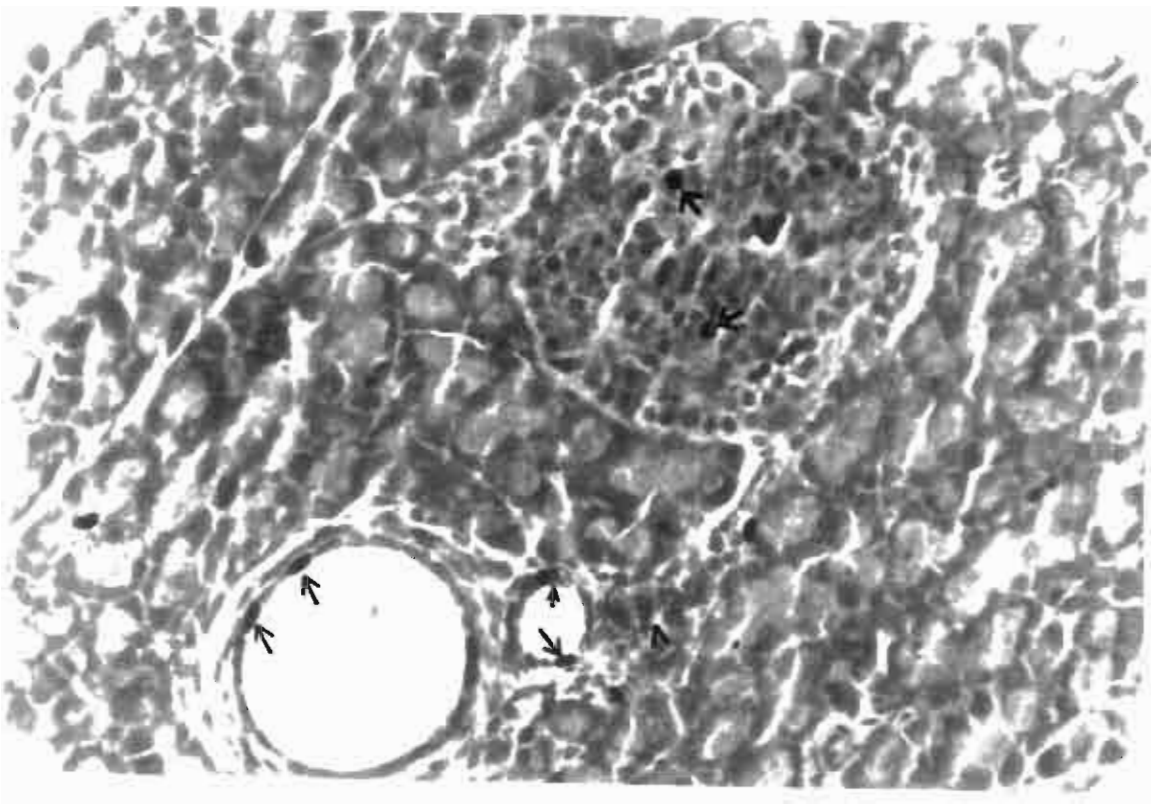


Figura 3. Neogénesis de células β a partir de células acinares y células ductales. Células β surgiendo por neogénesis a partir de células ductales en el día tres después de la dosis de aloxana Las células que tiñen para BrdU pueden observarse en ambos conductos (flechas grandes). Se observa claramente una celula ductal que expresa insulina (cabeza de flecha) y células β dentro de un islote que muestra incorporación de BrdU(flechas gruesas). Además, se oserva replicación de células β en el islote adyacente al conducto descrito (20X)

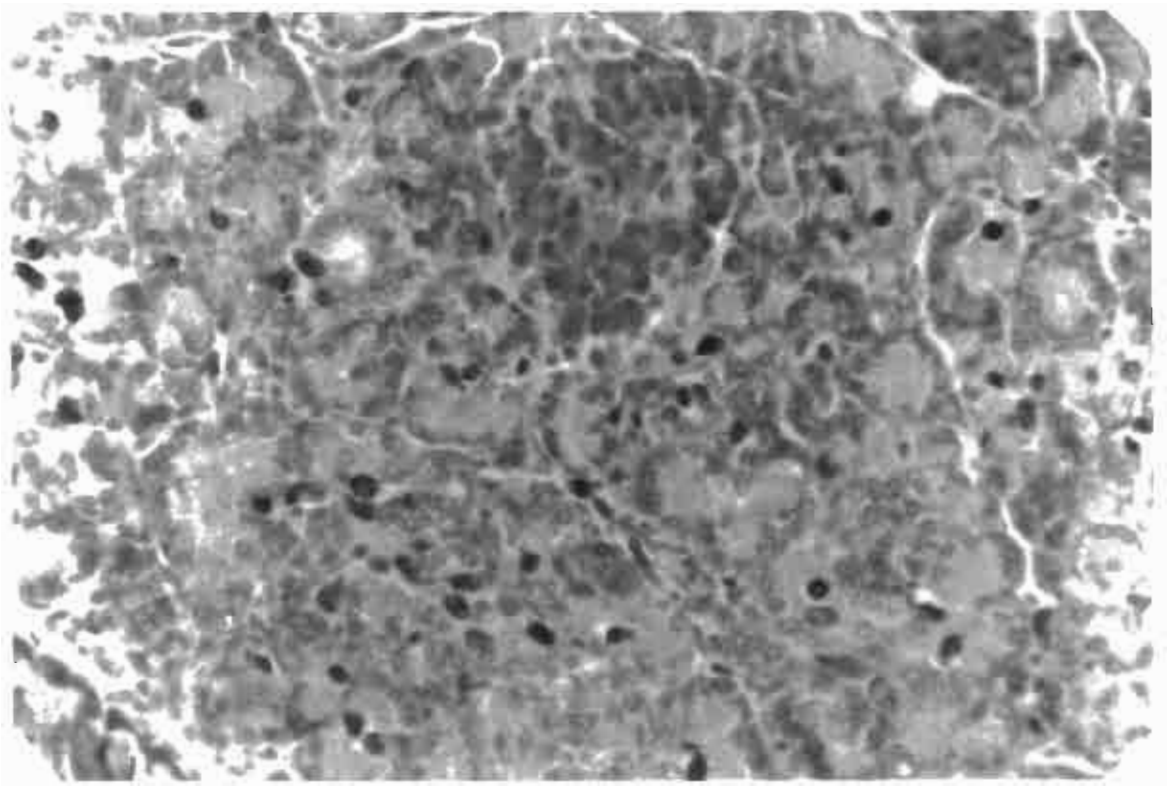


Figura 4. Cambios mostrados seis dias después de la administración de aloxana. Se aprecia una región focal en la que múltiples conductos presentan un número elevado de células teñidas para BrdU (flechas). Se puede observar claramente un islote en la región focal. (20X)

Se observaron células β extrainsulares dispersas entre el tejido acinar pancreático en el tercer día posterior a la administración de aloxana (Figura 5), asi como en el día seis, día en que también se aprecian islotes pequeños. No se apreciaron células extrainsulares en ratas tratadas con putrescina y estas no fueron abundantes en ratas tratadas con espermidina y se encontraron islotes de tamaño moderado en el día nueve, los que probablemente surgieron a partir de células acinares. En ratas tratadas con espermina en el día tres de tratamiento se observaron pocas células β extrainsulares, sin embargo, se aprecian conjuntos de células muy cerca uno de otro, los que parecen estar formados únicamente por células β.

Regeneración de células β intrainsulares

Las células β de ratas sacrificadas 3 días después de la administración de aloxana mostraron un índice de marcaje de BrdU aumentado (Tabla 4 y Figura 3). Sin embargo, esto no siempre significó un mayor número de células β en regeneración por islote, sino un mayor número de islotes mostrando regeneración, para el día 6 el índice de marcaje de BrdU en los islotes aumentó aún más que en el día tres (Tabla 4) y disinuyó en el día nueve Finalmente, doce días después de la administración de aloxana el índice de marcaje de las células β fue similar al grupo control sano.

El tratamiento con L-arginina durante todo el periodo de estudio no aumentó significativamente el índice de marcaje de BrdU en las células β intrainsulares con respecto al grupo tratado con aloxana (Tabla 4), e incluso fue inferior en el día 6 ($p < 0.001$).

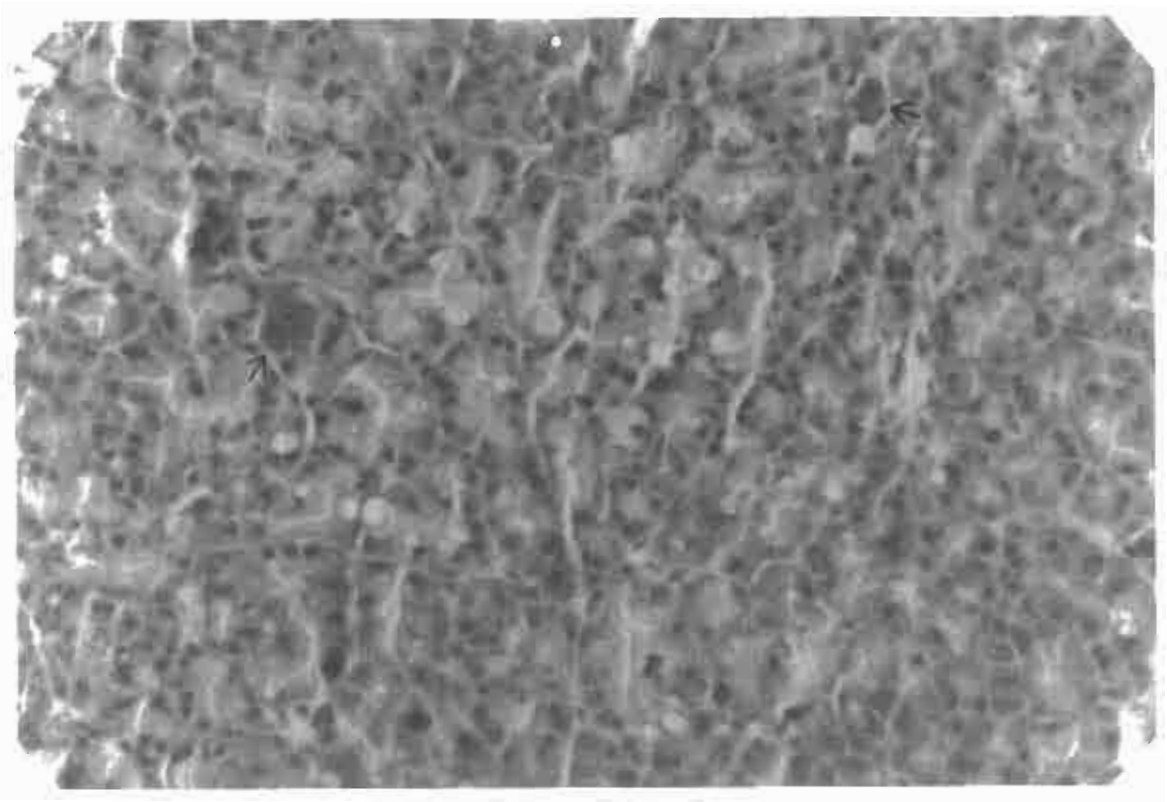


Figura 5. Formación de nuevas celulas β a partir de células acinares en ratas tratadas con aloxana. Pequeños grupos de células β entre el tejido acinar (flechas) y celulas acinares en replicacion en el dia tres posterior al tartamiento con aloxana (20X)

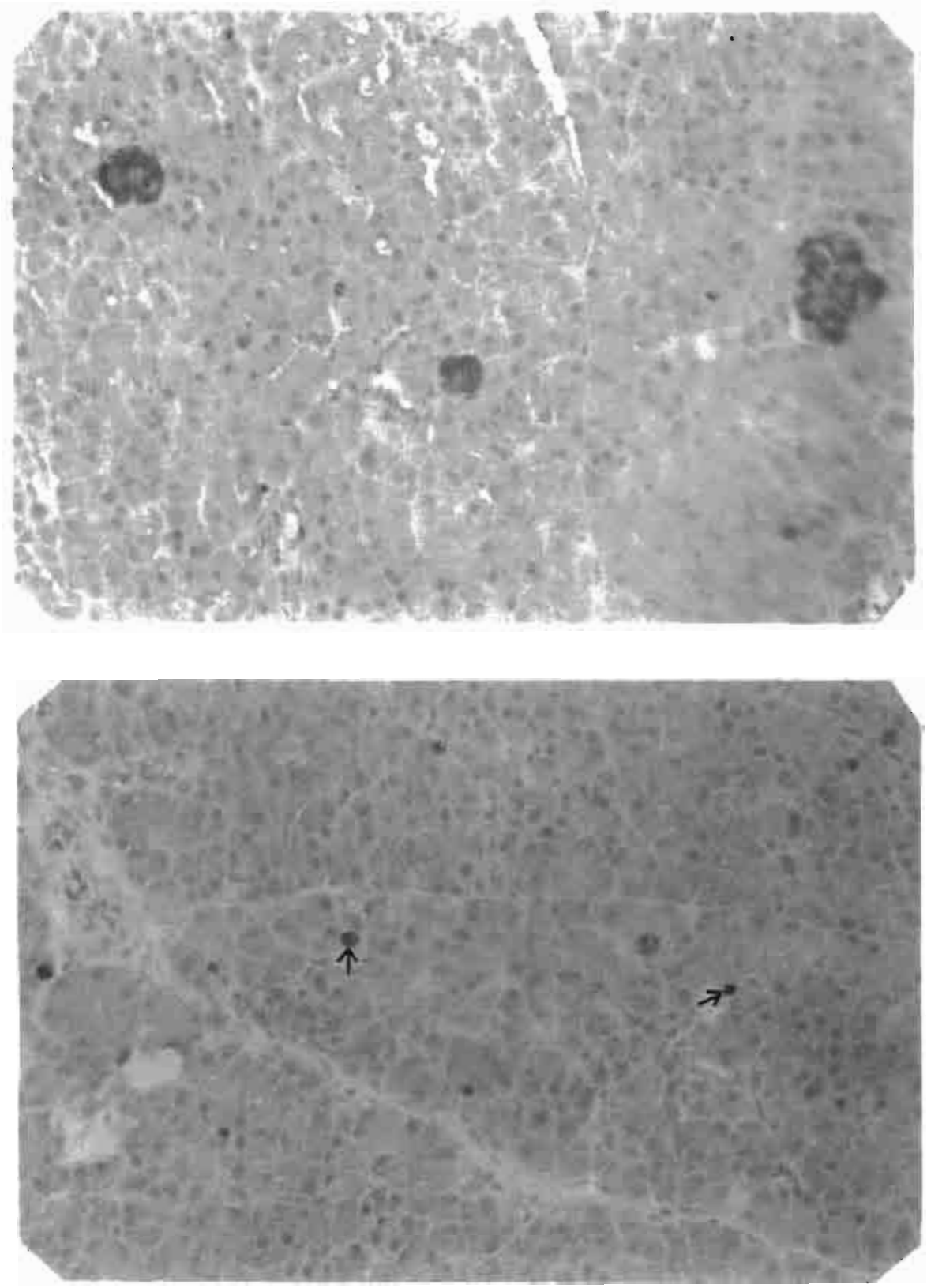


Figura 6. Cambios en la actividad celular ocasionados por el tratamiento con L-arginina a) Presencia de células extrainsulares e islotes pequeños en el dia seis de tratamiento con L-arginina 20X. b) Células acinares que muestran un indice de marcaje para BrdU elevado en el dia tres de tratamiento con L-arginina. 20X

Tabla 4. Indice de incorporación de BrdU (media ± D.E.) de células β en ratas con hiperglucemia temporal tratadas con L-arginina, putrescina, espermidina o espermina.

Tiempo (en dias)	(Control con hiperglucemia temporal)	L-arginina	Putrescina	Espermidina	Espermina
0 (Control sano)	0.34 ± 0.15				
3	0.62 ± 0.25▲	0.57 ± 0.17	0.43 ± 0.21	0.45 ± 0.23	0.38 ± 0.16
6	0 .96 ± 0.19▲	0.79 ± 0.23	0. 48 ± 0.18*	0.49 ± 0.21*	0.47 ± 0.15*
9	0. 49 ± 0.14▲	0.41 ± 0.19	0.52 ± 0.22	0.43 ± 0.17	0.74 ± 0.24
12	0.30 ± 0.14	0.37 ± 0.039	0.57 ± 0.20*	0.40. ± 0.18	0.41 ± 0.16

Para obtener el indice de incorporación (o marcaje) de BrdU se contaron 1000 células β. Se calculó de esta manera: células que tiñen/número total de células contadas (1000) X 100

▲Diferencias significativas a $p< 0.05$ comparado con el grupo control sano.
*Diferencias significativas a $p<0.05$ comparado con el grupo control con hiperglucemia temporal.

Las células β intrainsulares de ratas tratadas con putrescina mostraron un indice de marcaje de BrdU inferior al encontrado en ratas del grupo control con hiperglucemia temporal en el día seis ($p = 0.001$) y una elevación en el día doce ($p < 0.001$) (Tabla 5).

Los animales tratados con espermidina mostraron un índice de marcaje de células β inferior al grupo control con hiperglucemia temporal en el dia seis de tratamiento ($p = 0.001$) (Tabla 4), en los demás días estudiados no hubo diferencias estadisticamente significativas.

El tratamiento con espermina en el día tres de estudio no se relacionó con un aumento en el índice de marcaje de BrdU de células β intrainsulares (Tabla 4). En el dia seis se observó una disminución significativa con respecto al control con hiperglucemia temporal.

Replicación de células acinares

El índice de incorporación de BrdU de células acinares en ratas tratadas con aloxana aumentó a un nivel máximo en el día tres (Tabla 5) y permaneció elevado en el día seis con respecto al control sano, mientras que en ratas tratadas con L-arginina en el día tres el aumento fue superior al mostrado por las células acinares de ratas tratadas con aloxana en el mismo día ($p < 0.001$) (Figura 6b; Tabla 5) y disminuyó progresivamente hasta niveles similares al control sano en el día doce.

En ratas tratadas con putrescina el índice de incorporacion de BrdU de las células acinares fue inferior al grupo control con hiperglucemia temporal en los dias tres ($p < 0.05$), seis ($p = 0.001$) y nueve ($p < 0.001$) (Tabla 5).

Tabla 5. Indice de incorporación de BrdU (media ± D.E.) de células acinares en ratas con hiperglucemia temporal tratadas con L-arginina, putrescina, espermidina o espermina.

Tiempo (en días)	(Control con hiperglucemia temporal)	L-arginina	Putrescina	Espermidina	Espermina
0 (Control sano)	0.17 ± 0.06				
3	1.07 ± 0.40♠	3.35 ± 0.61*	0.36 ±0.03*	0.38 ± 0.05*	0 21 ± 0.02*
6	0.63 ± 0.15♠	1.14 ± 0.26*	0.27 ± 0.04*	0.45 ± 0.04	0.26 ± 0.03*
9	0.74 ± 0.15♠	0.27 ± 0.02*	0.31 ± 0.04*	0.24 ± 0.05*	0.32 ± 0 04*
12	0 12 ± 0.045	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.35 ± 0.05*

*Para obtener el índice de incorporación (o marcaje) de BrdU se contaron 1000 células acinares. Se calculó de esta manera: células que tiñen/número total de células contadas (1000) X 100.

♠Diferencias significativas a $p < 0.05$ comparado con el grupo control sano.
*Diferencias significativas a $p<0.05$ comparado con el grupo control hiperglucémico.

En ratas tratadas con spermidina el índice de incorporación de BrdU por las células acinares se comportó de manera similar a los grupos de ratas tratadas con putrescina (Tabla 5) y se observó una disminución significativa en los días seis y nueve ($p < 0.001$) con respecto al control con hiperglucemia temporal.

Finalmente, se observó un aumento en el índice de incorporación de BrdU por las células acinares en el día doce, con respecto al grupo control con hiperglucemia temporal, difiriendo de la putrescina y espermidina en que el aumento es gradual desde el tercer día de estudio.

DISCUSION

En este estudio evaluamos la capacidad de regeneración de las células β preexistentes mediante la incorporación de BrdU en relación a la alteración y recuperación de parámetros bioquímicos indicadores de la función pancreática, que incluyó las concentraciones séricas de glucosa, triglicéridos y colesterol total. Asimismo, determinamos si ocurre o no neogénesis de células β a partir de células acinares y ductales en las ratas tratadas con aloxana y si el tratamiento con L-arginina o con las poliaminas putrescina, espermidina o espermina tiene un efecto adicional.

La aloxana induce daño a las células β debido a la generación de especies reactivas de oxígeno, las que ocasionan daño a los constituyentes celulares. En un intento por reparar el DNA, usando para ello el NAD^-, las reservas de esta coenzima se agotan, por lo que la célula no puede llevar a cabo su metabolismo normal y muere (Okamoto, 1997).

Como se ha reportado por este laboratorio (Méndez y Balderas, 2001), la arginina promovió la recuperación de la función endocrina del páncreas después de la administración de una sola dosis i.p. de 120 mg de aloxana/kg de peso corporal. Los resultados de este estudio concuerdan con los de Lazarow, quien en 1952 reportó que la glucosa sérica recuperó sus niveles normales en una rata que recibió (i.p.) cuatro dosis subumbrales de aloxana (30 mg/Kg de peso corporal). Estos hallazgos, sin embargo, están en desacuerdo con aquellos publicados por otros investigadores, quienes afirman que el estado diabético en animales tratados con aloxana permance por meses o incluso por años. Tales diferencias podrían quizá ser explicadas por el hecho de que en el presente trabajo se administró la dosis de aloxana intraperitonealmente, en lugar de utilizar la via intravenosa y que la aloxana fue disuelta en solución salina, en lugar de solución ácida, siendo ésta última

la más empleada. Algo que también llama la atención es el empleo de altas dosis de aloxana que rebasan los 200 mg/kg de peso. En nuestra experiencia, la hiperglucemia es severa cuando se utilizan dosis de aloxana no oxidada superiores a 120 mg/kg, por ejemplo, se han alcanzado niveles de glucosa sérica superiores a 500 mg/dl cuando se administra una dosis de aloxana de 180 mg/kg de peso corporal y hasta por arriba de 800 mg/dl con una dosis de 200 mg /kg en 24 horas, sin embargo, el número de animales que muere se incrementa considerablemente.

La espermina, a una dosis considerablemente menor, resultó igualmente eficaz o incluso superior que la L-arginina en atenuar el aumento en los valores de los parámetros séricos en el día tres de tratamiento, mientras que con la putrescina y la espermidina hubo resultados menores pero igualmente significativos. Se ha reportado que la aminoguanidina, una sustancia similar a la arginina, previene la apoptosis causada por especies reactivas de oxígeno en células del ojo de rata, siendo más eficiente mientras mayor es el tiempo de incubación de las células en presencia de esta sustancia previo a la administración del H_2O_2 (Giardino, 1998). Por otra parte, las poliaminas inhiben la peroxidación de microsomas de hígado de rata, debido a su interacción con fosfolípidos de membrana (Tadolini y col., 1984), siendo más efectiva la espermidina que la espermina. Es probable que la L-arginina y las poliaminas, por la semejanza que comparten con la aminoguanidina, impidan la elevación de especies reactivas de oxígeno dentro de las células β, lo que permitiría reducir el daño ocasionado por aloxana a estas células.

Por otra parte, las poliaminas pueden afectar significativamente a las membranas biológicas (Schuber, 1989) y de esta manera modular la transducción y la transmisión de señales mediadas por receptores (Koenig y cols., 1983). Debido a sus propiedades

químicas, estas moléculas pueden cambiar la fluidez de las membranas por entrecruzamiento electrostático con diversos componentes membranales, modificando indirectamente diversas actividades membranales de manera simultanea. Hay evidencia de que las poliaminas pueden estabilizar enzimas asociadas con las membranas del reticulo endoplásmico y que inteactúan con los ribosomas el retículo endoplásmico rugoso (Raina y Telaranta, 1967). De manera similar, las poliaminas interactúan con estructuras en la superficie celular implicadas en diversas funciones de la insulina, modulando de esta manera el transporte y el metabolismo intracelular de varias sustancias.

Se ha reportado que la administración de difluorometilornitina (DFMO), un inhibidor de la ornitina descarboxilasa (ODC), inhibe la síntesis de DNA por las células acinares (Logsdon y col. 1992A), e impide su replicación en animales en que se ha llevado a cabo la destrucción de acinos mediante la administración de cerulina (Jurkowska y col., 1997), interfiriendo así con el proceso de regeneración pancreática que ocurriría en los siguientes catorce días. Además, al estudiar la línea celular AR42J, proveniente de células acinares, se encontró que éstas incorporan poliaminas (Nicolet y col., 1991) y que la administración de DFMO inhibe la expresión del gene que codifica para la amilasa pancreática (Logsdon y col., 1992B), sustancia que comúnmente se utiliza como marcador de células acinares. Por otro lado, se sabe que la administración de L-arginina puede activar la síntesis de poliaminas en las células (Tapiero y col , 2002; Bansal y Ochoa, 2003).

El análisis morfológico indica que la aloxana causó daño a las céluas β de los islotes pancreáticos, mismo que desencadenó una serie de eventos que buscaron restaurar su morfología inicial. Las células acinares de las ratas tratadas con arginina durante tres días mostraron un indice de incorporación de BrdU muy elevado con respecto

al grupo control con hiperglucemia temporal (el que solamente recibió aloxana) Sin embargo, éste no aumentó en las células β intrainsulares. Es probable, aunque nuestro trabajo no ofrece la respuesta, que la L-arginina estimule la liberación de insulina por las células β no dañadas, o que éstas la metabolicen para formar NO, que se sabe participa en la secreción de insulina, también, debido a que la dosis de L-arginina es superior a la dosis empleada de poliaminas, podría ser que la célula β produjera poliaminas a partir de ésta, en dosis superiores a las que se emplearon, o que tanto el efecto observado con L-arginina y con poliaminas se deba más a un efecto protector contra la acción dañina inicial de la aloxana, puesto que la administración de las sustancias estudiadas se llevó a cabo desde el momento en que se administró la aloxana, y se sabe que existen sustancias que protegen a las células β del daño que la aloxana puede causarles. De esta manera, la L-arginina y las poliaminas evitarían que un gran número de células β fueran dañadas por la aloxana, y por tanto, cuando se aplicaron, la replicación total de la masa de células β inducida por aloxana fue mucho menor, lo que concuerda con un menor grado de hiperglucemia al tercer día de tratamiento, cuando estas sustancias se administran adicionalmente a la aloxana. Si este resultara ser el mecanismo por el cual la L-arginina y las poliaminas reducen el grado de aumento en la glucemia, trigliceridemia y colesterolemia causados por la aloxana, esto explicaría, al menos parcialmente, la falta de estimulación de las poliaminas sobre la regeneración de las células β intrainsulares.

En ratas tratadas con aloxana encontramos un aumento en la regeneración de células β preexistentes y su neogénesis principalmente a partir de las células acinares en los días tres y seis después de una dosis única de aloxana de 120 mg/kg de peso corporal en ratas machos Sprague-Dawley. Esto explica parte de los resultados obtenidos previamente en

este laboratorio, que indican que las ratas tratadas con la misma dosis de aloxana y sin ningún tratamiento adicional se recuperan del estado hiperglucémico, restableciendo la función pancreática endocrina después de doce dias.

Waguri y col. (1997) encontraron que en el modelo de ratón diabético inducido por la perfusión selectiva de aloxana después de presionar la arteria mesentérica, la región pancreática dañada muestra neogénesis, mientras que la región no afectada muestra regeneración, alcanzando una recuperación completa después de un año. Interesantemente, ellos notaron que la incorporación máxima de BrdU por las células β ocurrió en el día cinco después de la inducción de diabetes.

Los resultados de este estudio, en el que también utilizamos BrdU, indican que la mayor incorporación de este marcador en la célula β ocurrió en el dia seis después de la inducción de la hiperglucemia transitoria (Tabla 4), y que en las células acinares se presenta en el día tres. Esta incorporación fue mayor en los dias tres y seis (Tabla 5) en presencia de L-arginina, y en el día doce en presencia de espermina, lo que podría explicarse como un efecto de esta poliamina sobre el proceso de replicación de las células acinares.

El aumento en la regeneración que se observó en las células β dentro de los islotes en ratas sacrificadas en el día tres (Figura 2a), podría explicar por qué la concentración de glucosa sérica disminuye desde el día seis en ratas tratadas con aloxana. La neogénesis de las células β a partir de las células acinares ha sido ampliamente documentada (Gu y Sarvetnik, 1993), e incluso se ha propuesto que las células acinares sean precursoras de las células ductales en las regiones focales, las que pueden diferenciarse a células β.

El marcado aumento en las células acinares que incorporaron BrdU en el día tres podría explicarse si consideramos a las células acinares como precursoras de las células que

habrán de diferenciarse a células β, aunque no podemos descartar que la aloxana también las dañe directa o indirectamente y que su replicación sea con el fin de remplazar a las células muertas, ya que se sabe que las células acinares también incorporan aloxana. Por otra parte, en ratones tratados con estreptozotocina se ha reportado que las células β surgen de células precursoras que se encuentran dentro de los islotes, aumentando considerablemente en número en tan solo una semana (Zulewski y col., 2001). Estudios similares se encontraron en islotes de rata y de humano cultivados *in vitro* (Guz y col., 2001). Nuestro estudio no descarta la posibilidad de que las células que incorporan BrdU provengan de células precursoras similares, lo cual podría ser posible.

Todos los procesos que intentan restablecer la cantidad normal de células β después de un estímulo diabetogénico están presentes, en menor o mayor grado, en la rata tratada con aloxana, es decir, replicación de células β intrainsulares, así como neogénesis de células β a partir de células ductales y muy probabemente de células acinares. Como prueba de ello esta el hecho de que tuvimos la suerte de capturar el proceso de neogénesis completo a través de la diferenciación de células ductales, además del proceso de regeneración, en una sola fotomicrografía tomada de una rata tratada con aloxana.

Aún cuando en este estudio solamente observamos el proceso de neogénesis completo de las células β a partir de conductos pequeños en una rata, y que por lo tanto resulta insuficiente para concluir que este tenga una participación importante en la recuperación de la función pancreática endocrina, estos resultados sugieren que puede ocurrir neogénesis de islotes a partir de células ductales en la rata tratada con aloxana.

Los mecanismos moleculares que controlan los procesos de regeneración y neogénesis de la población de células β no se conocen completamente, sin embargo, está

claro que ciertas sustancias tales como la proteína reg (Okamoto, 1997) y otras están involucradas (Bonner-Weir, 1994; Bonner-Weir y Smith, 1994). Este modelo podría ser utilizado para estudiar la expresión de sustancias especificas durante la regeneración y neogénesis de las células β pancreáticas, procesos que permiten la recuperación de la función endocrina normal de este órgano después de un insulto tóxico (diabetogénico).

Estos resultados muestran la gran adaptabilidad del páncreas endocrino para tolerar el daño y la capacidad potencial que permanece en el páncreas exocrino para participar en el restablecimiento de la homeostasis después de que la función endocrina de esta glándula ha sido afectada. Aún así, es interesante notar que las regiones focales no son abundantes en las ratas tratadas con aloxana a la concentración que nosotros utilizamos, puesto que solamente una región focal pudo ser observada en un único animal en el día seis posterior a la administración de aloxana. Esto no es suficiente para establecer diferencias cuantitativas entre la región focal y el resto del páncreas.

A excepción del tratamiento con espermina en el día doce, el tratamiento con esta sustancia, así como con las demás poliaminas no promueve la incorporación de BrdU por células β y células acinares más allá de lo que ocurre con L-arginina, aunque hay un mayor número de células ductales que se dividen en diferentes tiempos con el tratamiento con espermina. En el grupo control con hiperglucemia temporal la presencia de células β extrainsulares se asocia con un mayor índice de marcaje de BrdU de células acinares. Es probable que esto haya ocurrido en los días uno y dos en ratas tratadas con espermina, que no se evaluaron, puesto que en el día tres se presentan numerosos islotes pequeños. Que la espermina haya promovido la incorporación de BrdU por células ductales en los días tres y nueve de tratamiento, podria indicar que es posible que de alguna manera esté impedida la

síntesis de espermina en ratas tratadas con aloxana, puesto que se sabe que la aloxana daña al DNA y la célula invierte sus reservas energéticas en su reparación. Además, aunque los índices de incorporación de BrdU por células acinares son inferiores a los del tratamiento con L-arginina, se aprecia la tendencia a estimular la división de las células acinares en los días seis, nueve y doce por parte de la espermina, aunque sólo el último valor representa un aumento con respecto al control con hiperglucemia temporal y es estadísticamente significativo ($p < 0.05$). La división de las células acinares podría deberse a una acción de reacomodo celular después de que se han producido nuevos islotes, puesto que no se observa formación de nuevas células β extrainsulares. El hecho de que las ratas tratadas con L-arginina presenten un índice de marcaje de BrdU de células acinares mayor que el observado en las ratas tratadas con poliaminas pudo deberse a la diferente dosis utilizada, puesto que mientras que la dosis de L-arginina fue 10 mM, la de poliaminas fue 10 μM. Podría ser que el hecho de que la L-arginina esté presente en concentración superior, les permitiera a las células acinares sintetizar la o las poliaminas cuando estas se requieren, en una concentración mayor.

Al considerar la semejanza o diferencia de los datos aquí reportados con las de otras fuentes debe considerarse que en este trabajo se evaluó la capacidad de incorporación de BrdU a las cuatro horas después de su inyección, siendo que en la mayoría de los estudios utilizan 6, 12, o hasta 24 horas, por lo que en este estudio únicamente se marcan las células que en ese momento se encuentran en la fase S del ciclo celular y no arroja un valor acumulativo, como ocurre en estudios que reportan mayor incorporación de BrdU por células β, acinares y ductales.

La relevancia del presente trabajo radica en que se establece que tanto la L-arginina como las poliaminas impiden de manera eficacaz la elevación de los niveles séricos de glucosa, triglicéridos y colesterol total a la vez que permite emprender otros estudios para saber por qué mecanismos el páncreas endocrino responde a L-arginina y poliaminas, es decir, qué otras moléculas o procesos bioquímicos están implicados en la respuesta pancreática a dichas sustancias, y deja claro que aún pueden encontrarse otras sustancias que ofrezcan protección a las células β pancreáticas o que induzcan la recuperación pancreática endocrina después de un insulto diabetogénico. Asimismo, una idea más clara de cómo las poliaminas disminuyen el aumento en glucemia, trigliceridemia y colesterolemia en el día tres podría obtenerse si se estudia la posibilidad de que la administración de L-arginina o poliaminas en el momento de la administración de la aloxana o previo a ella bastará para observar tal efecto. Por otra parte, podría evaluarse el grado de daño a las células β ocasionado por la aloxana en presencia de L-arginina y poliaminas en tiempos más cortos, así como evaluar su masa y su volúmen, lo que permitiría obtener datos más cuantitativos, finalmente, podría emprenderse un estudio con pacientes diabéticos para determinar en qué grado estos resultados son extrapolables al ser humano.

CONCLUSIONES

El daño inducido por aloxana en los islotes pancreáticos de ratas Sprague-Dawley tratadas con 120 mg/kg de aloxana (i.p.) es revertido espontaneamente, observándose la proliferación de las céluals β intrainsulares y la neogénesis de este tipo de células a partir de células acinares y ductales. Estos parecen ser los mecanismos por los que los parámetros séricos alterados vuelven a la normalidad doce días después de la administración i.p. de aloxana.

La L-arginina y las poliaminas reducen parcialmente el aumento en la glucemia, trigliceridemia y colesterolemia que se observa en el dia tres en el grupo tratado con aloxana. El mecanismo probable por el cual esto ocurre es un efecto protector de dichas sustancias contra la acción citotóxica de la aloxana sobre las células β, impidiendo la muerte de estas células.

Finalmente, establecimos un modelo de daño a las células β que permite la recuperación rápida de éstas células. Modelo que si bien no es apropiado para estudiar los efectos crónicos de la diabetes, permite entender los mecanismos de regeneración pancreática y abre nuevas posibilidades de investigación sobre la función de las poliaminas y su precursor, la L-arginina, en la bioquimica y fisiología del páncreas.

REFERENCIAS

Abbas, A.K., Lichtman, A.H y Pober, J.S. (2000): Cytokines. En: Cellular and Molecular Immunology. Saunders, 4a. edición EE. UU., pp 235-269.

Ackermann, J.M., Pegg, A.E. y McCloskey, D.E. (2003). Drugs affecting the cell cycle via actions on the polyamine metabolic pathway. *Prog. Cell. Cycle. Res.* **5**: 461-8

A D.A. (1997). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **20**: 1183-1197.

Aguilar-Salinas, C.A., Velázquez Monroy, O., Gómez-Pérez. F.J., González Chávez, A., Esqueda, A.L., Molina Cuevas, V. y Tapia Conyer, R.; Encuesta Nacional de Salud 2000 Group. (2003). Characteristics of patients with type 2 diabetes in Mèxico: Results from a large population-based nationwide survey. *Diabetes Care* **26**: 427-445.

Allen, R.T., Cluk, M.W. y Agarwal, D.K. (1998). Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**:427-445.

Andreoli, T.E. (2000). Free radical and oxidative stress. *Am. J. Med.* **108**:650-651.

Asayama, K., Kooy, N.W y Burr, M.I. (1986). Effect of vitamin E deficiency and selenium deficiency on insulin secretory reserve and free radical scavenging systems in islet. decrease of islet manganosuperoxide dismutase. *J. Lab. Clin. Med.* **107**:459-464.

Atkinson, M.A. y Maclaren, N.K. (1996). The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **331**: 1428-1436.

Bach, J-F. (1994). Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr. Rev.* **15**: 516-542.

Bach, J-F. (1995). Insulin-dependent diabetes mellitus as a β-cell target disease of immunoregulation. *J. Autoimmun.* **8**:439-463.

Baggiolini, M., Dewald, B. y Moser, B. (1997). Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* **15**.675-705.

Bansal, V. y Ochoa, J.B. (2003). Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **6**: 223-8.

Bendtzen, K., Mandrup-Poulsen, T., Nerup, J., Nielsen, J.H., Dinarello, C.A. y Svenson, M. (1986). Cytotoxicity of human pI 7 interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. *Science* **232**: 1545-1547.

Bonner-Weir, S. (1994). Regulation of pancreatic β-cell mass *in vivo*. *Recent. Prog. Horm. Res.* **49**: 91-104.

Bonner-Weir, S. y Smith, F.E. (1994). Islet cell growth and the growth factors involved. *Trends. Endocrinol. Metabol.* **5**: 60- 64.

Bredt, D.S. y Snyder, S.H. (1994). Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 175-195.

Brennan, F.M. y Feldmann, M. (1996). Cytokines in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* **8**:872-899.

Cadenas, E. (1989). Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* **55**:137-166.

Childs, A.C., Mehta, D.J y Gerner, E.W. (2003). Polyamine-dependent gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**: 1394-406.

Corona de la Peña N., Sosa-Melgarejo. J.A., Román-Ramos, R. y Méndez, J.D. (2000). Inhibition of platelet aggregation by putrescine, spermidine and spermine in hypercholesterolemic rabbits. *Arch. Med. Res.* **31**: 546-550.

Davidson P.M, Campbell, I.L., Oxbrow, L., Hutson, J.M. y Harrison, L.C. (1989). Pancreatic beta cell proliferation in rabbits demonstrated by bromodeoxyuridine labeling. *Pancreas* **4**:594-600.

Debas, H.T. (1997). Molecular insights into the development of the pancreas. *Am. J. Surg. 174*: 224-227.

Defazio, A., Leary, J.A., Hedley, D.W. y Tattersall, M.H.N. (1987). Immunohistochemical detection of proliferating cells *in vivo. J. Histochem. Cytochem.* **35**: 571-577

Ebelt, H., Peschke, D., Bromme, H.J., Morke, W., Blume, R. y Peschke E. (2000). Influence of melatonin on free radical-induced changes in rat pancreatic beta-cells *in vitro. J. Pineal. Res.* **28**:65-72.

Eizirik, D.L. y Darville, L.I. (2001). β-cell apoptosis and defense mechanisms: lessons from type 1 diabetes. *Diabetes* (Suplemento 1) **50**: S64-S69

Ferrannini, E. (1998). Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr. Rev.* **19**: 477-490.

Floyd, J.C., Fajans, S.S., Conn, J.W., Knopf, R.F. y Rull, J. (1966). Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J. Clin. Invest.* **45**: 1487-1502.

Furchgott, R.F. y Zawadzki, J.V (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **228**:373-376

Giardino, I , Fard, A.K., Hatchell, D.L. y Brownlee, M. (1998). Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* **47**: 1114-1120.

Goldsby, R.A., Kindt, T.J. y Osborne, B.A. (2000). Cytokines. En: Kuby Immunology. Freeman, 4a. edición, EE. UU., Pp. 303-326.

Grewal, I.S., Rutledge, B.J., Fiorillo, J.A. Gu, L., Gladue, R.P., Flavell, R.A., y Rollins, B.J. (1997). Transgenic monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in pancreatic islets produces monocyte rich-insulitis without diabetes: abrogation by a second transgene expressing systemic MCP-1. *J. Immunol.* **159**:401-408.

Gu, D. y Sarvetnik, N. (1993). Epithelial cell proliferation and islet neogenesis in IFN-γ transgenic mice *Development* **118**: 33-46.

Gu, L., Tseng, S.C. y Rollins, B.J. (1999). Monocyte chemoattractant protein-1. *Chem. Immunol.* **72**:7-29.

Guz, Y, Nasir, I. y Teitelman, G. (2001). Regeneration of pancreatic β-cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinology* **142**: 4956-4968.

Harald, H.H., Schmidt, W., Warner, T.D., Ishii, K., Sheng, H. y Murad, F. (1992). Insulin secretion from pancreatic β cells caused by L-arginine-derived nitric oxides. *Science* **255**: 721-723.

Hardikar, A.A., Karandikar, M.S. y Bhonde, R.R. (1999). Effect of partial pancreatectomy on diabetic status in BALB/c mice. *J. Endocrinol.* **162**: 189-195.

Iatropoulos, M.G. y Williams, G.M. (1996). Proliferation markers. *Exp. Toxicol. Pathol.* **48**: 175-181.

Jörns, A., Munday, R., Tiedge, M. y Lenzen, S. (1997). Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated pancreatic islets in vitro. *J. Endocrinol.* **155**: 283-293.

Jurkowska, G., Rydzewska, G. y Andrzejewska, A. (1997). The influence of polyamines synthesis inhibition of pancreas regeneration and phospholipase D activity after acute caerulin induced pancreatitis in rats. Biochemical and ultrastructural study. *J. Physiol. Pharmacol.* **48**: 789-804.

Knowles, R.G. y Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **298**: 249-258.

Koenig, H., Goldtone, A. y Ly, C.Y. (1983). Polyamines regulate calcium fluxes in rapid plasma membrane response. *Nature* 305: 530-534.

Krinsky, N.I (1992). Mechanism of action of biological antioxidants. *P.S.E.B.M.* **200**:248-254

Krippeit-Drews, P., Krämar, C., Welker, S., Lang, F., Ammon, P.T.H. y Drews, G. (1999). Interference of H_2O_2 with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic β-cell. *J. Physiol.* **514**:471-481.

Kritzik, M.R., Krahl, T., Good, A., Krakowsky, M., St.-Onge, L., Gruss, P., Wright, C. y Sarvetnik, N. (2000). Transcription factor expression during pancreatic islet regeneration *Mol. Cell. Endocrinol.* **164**: 99-107.

Krolewski, A.S., Warram, J.H., Rand, L.I. y Kahn, C.R. (1987). Epidemiologic approach to the etioloy of type I diabetes mellitus and its complications. *N. Engl. J. Med.* **317**: 1390-1398.

Krönche, K-D, Fehsel, K. y Kolb-Bachofen, V. (1995). Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **376**:327-343.

Kubisch, H.M., Wang, J., Luche, R., Carson, E., Bray, M.T., Epstein, J.C. y Phillips, P.J. (1994). Transgenic copper/zinc superoxide dismutase modulates susceptibility to type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**:9956-9959.

Lacy, P.E. (1967). The pancreatic β cell. Structure and function. *N. Engl. J. Med.* **276**:187-195.

Lazarow, A. (1952). Spontaneous recovery from alloxan diabetes in the rat. *Diabetes* **1** 363-372.

Lenzen, S, Drinkgern, J. y Tiedge, M. (1996). Low antioxidantt enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free. Radic. Biol. Med.* **20**: 463-466.

Levin, S.R., Grodsky, G.M., Hagura, R., Smith, D.F. y Forsham, P.H (1972) Relationships between arginine and glucose in the induction of insulin secretion from the isolated, perfused rat pancreas. *Endocrinology* **90**: 624-631.

Logothetopoulos, J. (1972). Islet regeneration and neogenesis En: Handbook of Physiology: Endocrinology (N Freinkel,. ed.), vol. 1, Weverly Press, Inc., Baltimore, pp.67-76.

Logsdon, C.D., Guthrie, J., Alves, F. y Rosewicz, S. (1992A). Glucocorticoids have opposite effects on ornithine decarboxylase and cell growth in pancreatic acinar AR42J cells. *Yale J. Biol. Med.* **65**: 449-56.

Logsdon, C.D., Alves, F. y Rosewicz, S. (1992B). Role of polyamines in glucocorticoid effects on pancreatic acinar AR42J cell growth and differentiation. *Am. J. Physiol.* **262** (2 Pt 1):G285-90.

Luster, A.D. (1995). Chemokines-Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.* **338**:436-445.

Malaisse, W.J. (1982). Alloxan toxicity to the pancreatic β-cell: a new hypothesis *Biochem. Pharmacol.* **31**: 3527-3534.

Marton, L.J. y Pegg, A.E. (1995). Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**: 55-91.

McDaniel, M.L., Corbett, J.A., Kwon, G. y Hill, J.R. (1997). A role for nitric oxide and other inflammatory mediators in cytokine-induced pancreatic β-cell dysfunction and destruction. *Adv. Exp. Med. Biol.* **426**: 313-319.

Medina, M.A., Urdiales, J.L., Rodriguez-Caso, C., Ramirez, F.J. y Sanchez-Jimenez, F. (2003). Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*;**38**: 23-59.

Méndez, J.D. y Arreola, M.A. (1992). Effect of L-arginine on pancreatic arginase activity and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem. Int.* **28**: 569-575.

Méndez, J.D. y Zarzoza, E. (1997). Inhibition of platelet aggregation by L-arginine and polyamines in alloxan treated rats. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **43**: 311-318.

Méndez J.D. y Balderas, F. (2001). Regulation of hyperglycemia and dyslipidemia by exogenous L-arginine in diabetic rats. *Biochimie* **83**:453-458.

Moncada, S., Palmer, R.M.J. y Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**:109-142.

Morgan, D.M.L. (1994). Polyamines, arginine and nitric oxide. *Biochem. Soc. Trans.* **22**: 879-883.

Mordes, J.P. y Rossini, A.A. (1981) Animal models of diabetes. *Am. J. Med.* **70**: 353-361

Nakazaki, M., Kakei, M., Kariyama, N. y Tanaka, H. (1995). Involvement of ATP sensitive K^+ channels in free radicals-mediated inhibition of insulin secretion in rat pancreatic β-cell. *Diabetes* **44**:878-883.

Nakazaki, M., Kakei, M., Yaekura, k., koriyama, N., Morimitsu, S., Ichinari, K., Yada, T y Tei, C. (2000). Diverse effects of hydrogen peroxide on cytosolic Ca2+ homeostasis in rat pancreatic beta-cell. *Cell. Struct. Funct.* **25**:187-193.

Nicolet, T., Scemama, J.L., Pradayrol, L., Berthelemy, P., Seva, C y Vaysse, N (1991) Putrescine and spermidine uptake is regulated by proliferation and dexamethasone treatment in AR4-2J cells. *Int. J. Cancer.* **49**: 577-81.

Okamoto, H. (1997). New aspects to the fuctioning and regeneration of pancreatic β-cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **426**:301-311.

Otonkoski, T., Mally, M.I. y Hayek, A. (1994). Opposite effects of β-cell differentiation and growth on reg expression in human fetal pancreatic cells. *Diabetes* **43**: 1164-1166.

Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G. y Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* **327**:524-526

Palmer, R.M.J., Ashton, D.S. y Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**. 664-666.

Pegg, A.E. (1986). Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* **234**: 249-262.

Pegg, A.E., Shantz, L.M y Colemn, C.S. (1994). Ornithine decarboxilase. structure, function and translational regulation. *Biochem. Soc. Trans.* **22**: 846-852.

Pictect, R. y Rutter, W.J. (1972). Development of the embryonic endocrine pancreas. In *Handbook of Physiology.* Vol. 1. (ed. D. Steinerand), Baltimore, MD: William and Wilkins, pp. 25-66.

Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L, Thomas, D.P, Strynadka, K. y Simpson, I. (1992). Cytotoxic effects of cytokines on rat islets: evidence for involvement of free radicals and lipid peroxidation. *Diabetologia* **35**:409-413.

Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., Strynadka, K., Lakey, R.T.J. y Rajotte, V.R. (1996). Human pancreatic islet β-cell destruction by cytokines involves oxygen free radicals and aldehyde production. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**:3197-3202

Rabinovitch, A. y Suarez-Pinzon, W.L. (1998). Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem. Pharmacol.* **15**:1139-1149.

Rabinovitch, A. (1998). An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.* **14**:129-151.

Raina; A. y Telaranta, T. (1967). Association of polyamines and RNA in isolated subcellular particles from rat liver. Biochem. Biophys. Acta *138*: 200-203

Reaven, G.M. (1995). Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol. Rev.* **75**. 473-486.

Rerup, C.C. (1970). Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol. Rev.* **22**: 485-518.

Roberts, V.A., Fisher, C.L., Redford, S.M., Mcree, D.E., Parge, H.E., Getzoff, E.D. y Tainer, J.A. (1991). Mechanism and structure of superoxide dismutase. *Free Rad. Res. Comms.* **12-13**: 269-278.

Rosenberg, L. (1998). Induction of islet cell neogenesis in the adult pancreas . The partial duct obstruction model. *Microsc. Res. Tech.* **43**: 337-346.

Rosenberg L y Vinik, A.I. (1992). Trophic stimulation of the ductular cell axis: a new approach to the treatment of diabetes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **321**: 95-104.

Sander, M y German, M.S. (1997). The β-cell transcription factors and development of the pancreas. *J. Mol. Med.* **75**: 327-340.

Sandler, H, Andersson, A. y Hellerstrom, C. (1987). Inhibitory effects of interleukin-1 on insulin secretion, insulin biosynthesis, and oxidative metabolism of isolated rat pancreatic islets. *Endocrinology* **121**. 1424-1431

Schmidt, H.H.H.W., Warner, T.D., Ishii, K., Sheng, H. y Murad, F. (1992). Insulin secretion from pancreatic β cells caused by L-arginine-derived nitrogen oxides. *Science* **255**: 721-723.

Schuber, F. (1989). Influence of polyamines on membrane functions. Biochem. J. 260: 1-7.

Seiler N. (2003A). Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 1. Selective enzyme inhibitors. *Curr. Drug Targets* **4**: 537-64.

Seiler, N. (2003B). Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 2. Structural analogues and derivatives. *Curr. Drug Targets* **4**: 565-85.

Siedel, J., Hägele, E.O., Ziegenhorn, J. y Wahlefeld, A.W. (1983) Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency. *Clin. Chem.* **29**: 1075-1080.

Sjöholm, Å., Welsh, N., Sandler, S. y Hellerström, C. (1990). Role of polyamines in mitogenic and secretory responses of pancreatic β-cells to growth factors. *Am. J. Physiol.* **259**: C828-C833.

Sjöholm, Å., Welsh, N. y Hellerström, C. (1992). Lithium increases DNA replication, polyamine content, and insulin secretion by rat pancreatic β-cells. *Am. J. Physiol.* **262**: C391-C395.

Sjöholm, Å. (1993). Role of polyamines in the regulation of proliferation and hormone production by insulin-secreting cells. *Am. J. Physiol.* **264**: C501-C518.

Sjöholm, Å. (1996). Diabetes mellitus and impaired pancreatic β-cell proliferation. *J. Int. Med.* **239**: 211-220.

Sjöholm, Å., (1997). Glucose stimulates islet P-cell mitogenesis through GTP-binding proteins and protein kinase C-dependent mechanisms. *Diabetes* **46**: 1141-1147.

Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Torres, M., Oliver, G. y Gruss, P. (1997). The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing β-cells in the mammalian pancreas. *Nature* **386**: 399-402.

Stassi, G., Maria, R.D., Trucco, G., Rudet, W., Testi, R., Galluzzo, A., Giordano, C y Trucco, M. (1997). Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Exp. Med.* **186**: 1193-1200.

Suarez-Pinzon, W.L., Strynadka, K. y Rabinovitch, A. (1996). Destruction of rat pancreatic islet β-cells by cytokines involves the production of cytotoxic aldehydes. *Endocrinology* **137**:5290-5296.

Suarez-Pinzon, W.L., Szabo, C. y Rabinovitch, A. (1997). Development of autoimmune diabetes in NOD mice is associated with the formation of peroxynitrite in pancreatic islet beta-cells. *Diabetes* **46**:907-911.

Sumoski, W., Baquerizo, H. y Rabinovitch, A. (1989). Oxygen free radical scavengers protect rat islet cells from damage by cytokines. *Diabetologia* **32**:792-796.

Tadolini, B., Carini, L., Landi, L., Varani, E. y Pasquali, P. (1984). Polyamine binding to phospholipid vesicles and inhibition of lipid peroxidation . *Biochem. Biophys. Res.* **122**: 550-555

Takasu, N., Asawa, T., Komiya, I., Nagasawa, Y. y Yamada, T. (1991). Alloxan-induced DNA strand breaks in pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* **266**: 2112-2114.

Tanabe, K., Okuya, S., Tanizawa, Y., Matsutani, A. y Yoshimoto, O. (1997). Leptin induces proliferation of pancreatic β cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241**: 765-678.

Tanigawa, K., Nakamura, S., Kawaguchi, M , Xu, G., Kin, S. y Tamura, K. (1997). Effect of aging on β-cell function and replication in rat pancreas after 90% pancreatectomy. *Pancreas* **15**: 53-59.

Tapiero, H., Mathe, G., Couvreur, P. y Tew, K.D. (2002). I. Arginine. *Biomed. Pharmacother.* **56**: 439-45.

Teti, D., Visalli, M. y McNair, H. (2002). Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **781** 107-49.

Thomas, T. y Thomas, T.J. (2003). Polyamine metabolism and cancer. *J. Cell. Mol. Med.* 7: 113-26.

Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J. y Lenzen, S. (1997). Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* **46**:1733-1742.

Tiedge, M., Lortz, S., Munday, R. y Lenzen, S. (1998). Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species. *Diabetes* **47**:1578-1585.

Trinder, P. (1969). Determination of glucose in blood using oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.* **6**: 24-30.

Waguri M, Yamamoto K, Miyagawa J-I, Tochino Y, Yamamori K, Kajimoto Y, Nakajima H, Watada H et al. (1997). Demonstration of two different processes of β-cell regeneration in a diabetic mouse model induced by selective perfusion of alloxan. *Diabetes* **46** 1281-1290.

Wahlefeld, A.W Methoden der enzymatischen analyse. En: Bergmeyer editor, Verlag Chemie, Weinheim, 1974, pp 1878.

Wallace, H.M., Fraser, A.V. y Hughes, A. (2003). A perspective of polyamine metabolism. *Biochem. J.* **376**(Pt 1):1-14.

Xu, B., Moritz, J.T. y Epstein, P.N. (1999). Overexpression of catalase provides partial protection to transgenic mouse beta cells. *Free Radic. Biol. Med.* **27**:830-837.

Yamada, K., Inada, Ch., Otabe, S., Takane, N., Hayashi, H. y Nonaka, K. (1993). Effects of free radical scavengers on cytokine actions on islet cells. *Acta Endocrinol.* **128**:379-384.

Yoon, J.W., Jun, H.S. y Santamaria, P. (1998). Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Immunity* **27**: 109-122.

Zulewski, H. Abraham, E.J., Gerlach, M.J., Daniel, P.B., Moritz, W., Müler, B., Vallejo, M., Thomas M.K. y Habener, J.F. (2001). Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate *ex vivo* into pancreatic endocrine, exocrine,and hepatic phenotypes. *Diabetes*: **50**: 521-533.

APÉNDICE A

Procesamiento del tejido para microscopía de luz

El procesamiento del tejido para microscopía de luz implica, primero, el preparar el tejido para el corte en el microtomo. Esto se logra incluyendo el tejido en parafina, sin embargo, para que la parafina penetre al tejido, es necesario extraer el agua tisular y aclarar el tejido con xilol. El proceso completo se realizó como se indica a cntinuación.

1.- Se sacrificó la rata, se extrajo el páncreas y se colocó en solución fijadora de formalina al 10% por 2 horas

2.- Se sacó el tejido y se colocó en alcohol al 96% durante 1 hora

3.- Se repitió el paso anterior

4.- Se retiró el tejido y se colocó en alcohol absoluto durante 1 hora

5.- Se repitió el paso anterior

6.- Se retiró el tejido y se colocó en xilol durante 1 hora

7.- Se repitió el paso anterior

8.- Se retiró el tejido y se colocó en parafina líquida

9. Se retiró el tejido y se incluyó en una unidad de inclusión.

10.- Se dejó el tejido en la unidad de inclusión a temperatura ambiente hasta que se formó el bloque con la parafina líquida que se virtió al tejido.

11.- Una vez que los bloques se formaron y se enfriaron completamente, se colocó la unidad de inclusión en el refrigerador para ayudar a la mejor compactación de la parafina del bloque.

12.- Se retiraron los bloques de la unidad de inclusión y se guardaron a temperatura ambiente.

13 - Cuando se utilizó el bloque, éste fue colocado previamente en el refrigerador.

14) Se cortó en el microtomo a 4 ó 5 μm.

15 - La serie de cortes se colocó en un portaobjetos y se les adicionó alcohol al 50% (en agua), para que los cortes de tejido se estiraran, evitando así su plegamiento.

16.- Los cortes se colocaron en agua ligeramente caliente (a una temperatura por arriba del punto de fusión de la parafina) conteniendo una cantidad pequeña de gelatina y se vuelvieron a estirar para evitar su plegamiento.

17.- Se separó la serie de cortes individualmente y se recuperaron colocando uno en cada laminilla.

18 - Las laminillas conteniendo las muestras de tejido se colocaron en la estufa de laboratorio a desparafinar durante 1 hora.

APÉNDICE B

Técnica inmunohistoquímica

El procesamiento de las muestras de tejido para inmunohistoquímica indirecta, técnica que consiste en detectar una sustancia en el tejido, en nuestro caso insulina, mediante la aplicación de dos anticuerpos, se describe más adelante. En dicha técnica, se aplica un anticuerpo primario, el cual va dirigido contra la sustancia que deseamos detectar en la muestra de tejido y, posteriormente, un anticuerpo secundario, el cual va dirigido contra la inmunoglobulina que constituye al anticuerpo primario. El anticuerpo secundario se administra como un complejo que contiene peroxidasa, después se administra un agente revelador del anticuerpo secundario y esto nos indicará la presencia de la sustancia de interés

La técnica inmunohistoquímica debe llevarse a cabo cuidadosamente, respetando los tiempos establecidos para que la inmunotinción se lleve a cabo eficientemente. Por la importancia que ha recibido en los últimos años, en esta tesis hemos decidido separarla en varias fases e incluir todos los detalles que tuvimos que cuidar para su repetición exacta en cada una de las muestras que se trabajaron. Los reactivos utilizados fueron de la empresa Biogenex.

Fases de la inmunohistoquímica

a) Trabajo general previo.

b) Recuperación del antígeno BrdU.

c) Inmunotinción del antígeno BrdU.

d) Cubrir la biotina libre del antígeno secundario.

e) Inmunotinción del antígeno insulina.

f) Contraste y montaje.

a) Trabajo general previo.

1.- Se contó con un tren de tinción que tenia dos recipientes con cada una de las siguientes concentraciones de etanol: 100%, 96%, 90%, 80% y 70%, asi como también un recipiente para preparar agua amoniacal en el momento requerido y un recipiente con hematoxilina de Harris.

2.- Se revisó que la temperatura de la estufa que se utilizó fuera constante (70°C).

3- Se colocaron las laminillas conteniendo el tejido en una canastilla para laminillas, y se introdujeron en la estufa a 70°C, donde permanecieron durante 20 minutos. En este tiempo se desprendió la mayor parte de la parafina.

4.- Se retiró la canastilla de la estufa y fue sumergida inmediatamente (sin permitir que las laminillas se enfriaran) en xilol durante 10 minutos.

5.- Después se transfirieron las canastillas a otro recipiente con xilol y se sumergieron 20 veces

6.- Se repitió el paso anterior en un tercer recipiente con xilol.

7.- Se sumergió la canastilla 20 veces en alcohol absoluto.

8.- Se repitió el paso anterior en otro recipiente conteniendo alcohol absoluto.

9.- Como en los pasos 7 y 8, se sumergieron las canastillas en etanol al 96%, 90%, 80% y 70%.

10 - Se virtió solución salina amortiguada con fosfatos (PBS; pH 7.4) en un recipiente Coplin y se colocaron las laminillas en él.

11.- Después de 3 minutos se descartó el PBS

12.- Se adicionó más PBS.

13.- Después de 1 minuto se desechó el PBS.

b) Recuperación del antígeno BrdU

14.- Se vació ácido clorhídrico 2 N en el recipiente Coplin y se dejó durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se colocó el recipiente Coplin a 70°C durante 15 minutos

15.- Se desechó el HCl.

16.- Se agregó tetraborato de sodio ($Na_2B_2O_7$; bórax) 0.1 M al recipiente Coplin.

17.- Se regresó el tetraborato de sodio al recipiente en que se tenía la solución al 0 1 M.

18.- Se llenó con PBS

19.- Se desechó el PBS.

20 - Se adicionó más PBS al recipiente Coplin y se dejaron las laminillas durante 20 minutos.

21.- Cuando transcurrieron 10 minutos, se retiró el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% del refrigerador para que alcanzara la temperatura ambiente.

22.- Se desechó el PBS.

c) Tinción del antígeno BrdU

23.- Se vació peróxido de hidrógeno al 3% (preparado en metanol absoluto) en el recipiente Coplin y se esperó 15 minutos.

24.- Se regresó el peróxido de hidrógeno a su frasco

25.- Se adicionó PBS

26.- Se desechó el PBS

27.- Se adicionó más PBS

28.- Sin desechar el PBS, se retiraron las laminillas del recipiente Coplin, se secaron con gasa un poco más allá de los bordes del corte histológico, se marcaron con un plumón especial (adquirido con los distribuidores de reactivos para inmunohistoquimica) y se colocaron en una cámara húmeda, teniendo el máximo cuidado de que los cortes no se secaran

29.- Se adicionó el reactivo bloqueador de proteínas Power Block (solución amortiguada de caseina; dilución 1:100) y se dejó incubando por 45 minutos.

30.- Se removió el exceso del reactivo bloqueador de proteínas inclinando la laminilla.

31.- Se aplicó el anticuerpo primario contra BrdU (anticuerpo monoclonal de ratón; dilución 1:100) y se incubó durante 3 horas.

32.- Se lavó con PBS (a temperatura ambiente), dirigiendo el chorro de PBS hacia un lado, donde no estaba el tejido, manteniendo la laminilla lo suficientemente inclinada para que el PBS fluyera rápidamente.

33.- Se adicionó el anticuerpo secundario (anticuerpo policlonal biotinilado de cabra contra ratón; dilución 1:50) y se incubó durante 45 minutos.

34. Se lavó con PBS.

35.- Se adicionó el complejo estreptavidina-peroxidasa (dilución 1:20) y se incubó durante 30 minutos.

36.- Se lavó con PBS.

37.- Se adicionó 3,3'-diaminobencidina (DAB) y se dejó durante 3 a 5 minutos.

38.- Se lavó muy bien con suficiente PBS.

d) Cubrir la biotina libre del anticuerpo secundario

39.- Conforme se detuvo la incorporación del DAB por las laminillas lavándolas con PBS, fueron colocadas en un recipiente Coplin conteniendo PBS.

40.- Como en el paso 28, se retiraron las laminillas del recipiente Coplin y fueron colocadas en una cámara húmeda.

41.- Se adicionó estreptavidina para cubrir la biotina del anticuerpo secundario.

42.- Se lavó con PBS.

43.- Se adicionó biotina para cubrir los sitios fijadores de biotina de la estreptavidina.

44.- Se lavó con PBS.

e) Inmunotinción de la insulina

45.- Se adicionó el reactivo bloqueador de proteínas (preparado 1 en 10 con PBS) y se incubó durante 45 minutos.

46.- Como en el paso 30, se removió el exceso del agente bloqueador de proteínas, sin lavar.

47.- Se adicionó el anticuerpo primario contra insulina (anticuerpo policlonal de cobayo; dilución 1:50) y se incubó durante una hora.

48.- Se lavó muy bien con PBS.

49.- Se adicionó el anticuerpo secundario (anticuerpo policlonal biotinilado de conejo contra cobayo; dilución 1:50) y se incubó durante 45 minutos.

50.- Se lavó muy bien con PBS.

51.- Se adicionó el complejo estreptavidina-fosfatasa alcalina (dilución 1.20) y se incubó durante 45 minutos.

52.- Se lavó con PBS.

53.- Se adicionó nueva fucshina y se dejó durante 2 a 5 minutos.

54.- Se lavó muy bien con PBS.

f) Contraste y montaje

55.- Se colocaron las laminillas en una canastilla y fueron sumergirdas en agua de la llave, moviendo la canastilla.

56 - Se transfirió la canastilla a hematoxilina durante 5 segundos, aproximadamente.

57 - Después en agua de la llave.

58 - Se cambió el agua de la llave y se sumergó la canastilla, permitiendo que el agua cayera en el recipiente sin que el flujo directo del agua incidiera sobre el tejido, pues podría desprenderse.

59.- Se transfirieron las laminillas a agua amoniacal.

60.- Luego se enjuagaron nuevamente en agua de la llave.

61.- Se procedió a deshidratar las laminillas, colocándolas en la serie de alcoholes, como en los pasos 7 a 9, pero en orden inverso, es decir, se comenzó en alcohol al 70% y se terminó en alcohol absoluto.

62.- Se permitió que las laminillas se secaran.

63.- Se colocó un poco de medio de montaje acuoso en cada una de las laminillas.

64.- Se cubrió con un cubreobjetos.

65.- Se aplicó barniz en los bordes del cubreobjetos. De esa manera, las laminillas estuvieron finalmente disponibles para ser observadas.

APÉNDICE C

Solución de formaldehído (formol) amortiguado al 10%

a) Reactivos

Los reactivos para preparar la solución amortiguada de formaldehído al 10% son los siguientes:

- formaldehído (37 a- 40%) (CH_2O) 100 ml.
- fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) 4 g.
- fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) 6.5 g.
- agua destilada

b) Procedimiento de preparación

- Se pesó tanto el NaH_2PO_4 como el Na_2HPO_4 por separado.
- Se Colocó agua caliente (≅ 90C°) en un recipiente, se adicionó el fosfato monobásico y dibásico por separado y se agitó en cada caso.
- Se dejó enfriar y se adicionó el l resto del agua.
- Se virtió el formaldehído y se agitó con una varilla de vidrio.
- Se guardó el formol bien tapado.

APÉNDICE D

Cómo preparar el PBS (Phosphate-buffered saline; solución salina amortiguada con fosfatos)

Los tejidos presentan iones en solución. Adicionar agua destilada a una preparación tisular puede dañar seriamente a las células, por ello, existen varios sistemas amortiguadores, uno de ellos es el PBS.

a) Reactivos

Los reactivos para preparar la solución amortiguada de fosfatos son los siguientes

- cloruro de sodio (NaCl) 7.20 g.
- fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) 0.43 g.
- fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) 1.48 g.
- agua destilada (La suficiente para aforar a 1 litro).

b) Procedimiento de preparación

- Se virtió agua destilada en un matraz Erlenmeyer y se colocó en una parrilla de laboratorio para que se calentara. Una vez que aumentó considerablemente la temperatura, pero que no está muy caliente, se virtieron las sustancias y se agitó hasta que se disuelvan.
- Se dejó enfriar (el volumen de los líquidos está en proporción directa con la

temperatura), se transfirió a un matraz aforado y se llevó a 1 litro con agua destilada.

Neogénesis y regeneración de las células β pancreáticas

Roberto de Haro-Hernández,* José D. Méndez*

Recepción versión modificada: 18 de junio del 2001 aceptación: 5 de diciembre del 2001

Resumen

Objetivo: Revisar la literatura biomédica acerca de la neogénesis y regeneración de las células β pancreáticas con énfasis en la regulación de estos procesos.
Diseño: Se localizaron los artículos más relevantes sobre el tema mediante una búsqueda en la base de datos MEDLINE que comprendió de 1990 a 2000.
Resultados: Los datos reportados en la literatura demuestran que la diferenciación de los islotes de Langerhans a partir de conductos pancreáticos pequeños durante la formación del páncreas, en condiciones normales no continúa. Sin embargo, se ha determinado que en ciertos modelos experimentales in vivo *la formación de nuevas células β puede ocurrir por neogénesis, para esto es muy importante la expresión del gen Pax 4. El proceso de regeneración de células β es inducido por varias sustancias, entre ellas glucosa, varias hormonas y ciertos factores de crecimiento.*
Conclusiones: Los mejores resultados observados con las sustancias que estimulan el proceso de regeneración de las células β se han obtenido empleando concentraciones que rebasan los niveles fisiológicos, por lo que su posible importancia terapéutica no es muy clara. Sin embargo, existen posibilidades reales de que la proteína Reg pudiera, en el futuro, tener aplicación clínica.

Palabras clave: *Páncreas, islotes de Langerhans, célula β, neogénesis, regeneración, Pax 4, proteína Reg, glucosa, poliaminas.*

Summary

Objective: To review the literature on β-cell neogenesis and regeneration, with special interest in substances that regulate such processes.
Design: Representative papers were selected through a computer MEDLINE search from 1990 to 2000.
Results: Several studies showed that once islets of Langerhans developed from small pancreatic ducts, this process did not continue in normal adult individuals. However, it has been published that new β-cell formation can occur in vivo *in certain experimental models through neogenesis, in which gene pax 4 is extremely important. On the other hand, substances that stimulate the regenerative process of β-cells include glucose, several hormones and certain growth factors.*
Conclusions: Substances that stimulate the regenerative process commonly express this effect in elevated, non-physiologic concentrations; thus, their possible therapeutic importance is not yet clear. Nevertheless, the Reg protein, present in regenerative pancreas and implied in neogenesis process, has actual possibilities of becoming therapeutically important.

Key words: *Pancreas, islets of Langerhans, β-cell, neogenesis, regeneration, pax 4, Reg protein, glucose, polyamines.*

*Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Metabólicas.
Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Roberto de Haro Hernández, 4° piso, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Introducción

El páncreas es una glándula que presenta función tanto exocrina como endocrina. La secreción exocrina consta de enzimas que son secretadas por los ácinos pancreáticos y vertidas al duodeno. Éstas cumplen la función de facilitar la digestión de los alimentos. La secreción endocrina, por otra parte, la constituyen varias hormonas que participan en la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Dichas hormonas son producidas y secretadas por las células de los islotes de Langerhans, pequeños grupos celulares dispersos entre los ácinos pancreáticos, cada uno formado por un grupo de células β, rodeado de otros tipos celulares endocrinos.[1] Las células α secretan glucagón, las células β secretan insulina, las células γ secretan somatostatina y las células pp secretan el polipéptido pancreático. Los islotes de Langerhans presentan además otros tipos celulares no endocrinos, como fibroblastos y macrófagos. El volumen de los islotes comprende del 1 a 2% del tejido pancreático, mientras que las células β constituyen de un 60 a 70% de la población celular de los islotes de Langerhans.

La insulina es sintetizada exclusivamente por las células β pancreáticas y cumple la función de regular de manera muy precisa los niveles de glucosa sanguínea, actuando principalmente sobre hepatocitos, adipocitos y células del músculo estriado, para favorecer la captación de glucosa.[2] Además, posee actividad anabólica, favoreciendo la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas.[2] Cuando por alguna razón disminuye o cesa su producción y liberación al sistema circulatorio o bien no cumple la función esperada, el individuo presenta síntomas característicos de diabetes,[2-4] como son: altas concentraciones de glucosa en el plasma sanguíneo, polidipsia y polifagia. El funcionamiento de las células β pancreáticas suele afectarse en el humano. Existen más de 100 millones de personas diabéticas en el mundo.

En condiciones normales las células β tienen un índice de regeneración de solamente 3% por día en el individuo adulto y disminuye con la edad.[5,6] Aunque esta es una cifra muy baja, resulta suficiente para sostener una población celular que produzca y secrete insulina en cantidad apropiada para satisfacer su demanda en individuos sanos. Sin embargo, en pacientes con diabetes tipo 1, la insulina liberada es insuficiente y esto se debe, principalmente, a que al momento de su diagnóstico, entre 80 y 90% de las células β han sido destruidas.[7] Además, el o los factores que desencadenan dicha disminución continúan dañando a las células restantes, hasta su desaparición.[4,7] La administración parenteral de insulina ha sido la terapia empleada por más de siete décadas para el tratamiento de la diabetes tipo 1 y para los pacientes con diabetes tipo 2, cuando en estos últimos las sulfonilureas ya no son efectivas para estimular la liberación de insulina. Sin embargo, debido a que la ciencia médica no ha podido imitar la forma tan precisa en que el páncreas secreta dicha hormona, comúnmente se presentan alteraciones a largo plazo que dañan a otros órganos, lo que ha propiciado la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento. Resulta evidente que si se encontrara la forma de estimular la proliferación de las células productoras de insulina, de manera que se lograra la regeneración de la masa celular inicial a partir de la población disminuida, o al menos hacer posible la recuperación parcial de la función pancreática en el paciente con diabetes, su tratamiento sería más prometedor, puesto que se evitarían las complicaciones a largo plazo que la administración de insulina exógena no es capaz de prevenir.[8,9]

Modelos experimentales para estudiar la regeneración pancreática

Aun cuando el índice de regeneración de las células productoras de insulina es muy bajo, este ha podido ser aumentado considerablemente utilizando modelos experimentales. La disminución en el número de células β es una estrategia que ha permitido comprender algunos factores que intervienen en su regeneración. Entre los procedimientos más comunes para disminuir el número de células β están: a) pancreatectomía subtotal,[10] en la que se retira 90% del páncreas y se genera un estado diabético en los animales intervenidos; b) pancreatectomía parcial,[11] en la cual se extirpa entre 50 y 60% del tejido pancreático, tiene la ventaja sobre la anterior de que no se presenta un estado diabético, por lo que no hay hiperglucemia, lo que permite estudiar el proceso de regeneración en condiciones más semejantes a lo normal; c) administración de sustancias que destruyen selectivamente las células pancreáticas, como la aloxana[12] y la estreptozotocina;[11] y d) destrucción inmune en animales transgénicos cuyas células β producen el interferón gamma.[13] En estos casos, ocurre formación de nuevas células β productoras de insulina.

Por otra parte, el cultivo de islotes en condiciones apropiadas, ofrece la ventaja de que la interacción con otros tipos celulares es reducida. En este modelo de investigación se ha preferido el uso de islotes fetales, en los cuales hasta 95% de las células presentes son células β y la división celular que se observa es mayor que en islotes aislados de animales adultos.[14] En algunos trabajos[15] se han utilizado también islotes de humano. Asimismo, las líneas celulares[16] han arrojado resultados importantes no solamente en el estudio de la regeneración, sino también en múltiples aspectos de la regulación del metabolismo de las células β.

Proliferación celular en la regeneración

Existen varias formas de evaluar la proliferación celular, éstas van desde el registro de la diferencia en peso del órgano o tejido, hasta el uso de anticuerpos. El registro del peso del órgano como índice de proliferación celular puede conducir a errores, puesto que la ganancia en peso puede deberse a la entrada de líquido o a la infiltración de otras células, como ocurre en la inflamación.[17] Por razones similares, la medición de la cantidad de DNA, como factor representativo de proliferación celular puede no ser tan exacto como se desea, de manera que resulta más conveniente evaluar el índice mitósico. El índice mitósico se determina contando las células en división, el número resultante se divide entre 1,000 y se multiplica por 100. Es común evaluar la proliferación celular mediante la administración de colchicina, en cuyo caso se cuentan las figuras mitósicas detenidas en la metafase del ciclo celular. También se ha utilizado la administración de timidina tritiada (^{3}H-timidina), que se evalúa mediante autorradiografía. Actualmente se prefiere el uso de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU).[12,17,18] Esta sustancia, al igual que la ^{3}H-timidina, se incorpora al material genético en la fase S del ciclo celular, y a diferencia de la ^{3}H-timidina, puede hacerse evidente mediante el empleo de un anticuerpo contra la sustancia, la técnica es más rápida y no expone al investigador a radiación.[17,18]

Neogénesis

Durante la formación del páncreas en el desarrollo embrionario, los islotes de Langerhans se desarrollan a partir del epitelio de conductos pequeños,[19] y *de novo* a partir del mesénquima pancreático.[20] Parece ser que en los mamíferos después de las primeras semanas posteriores al nacimiento ya no existe formación de nuevos islotes; sin embargo, en estudios llevados a cabo *in vivo* en animales adultos, se ha demostrado, mediante microscopía de luz y electrónica, que la recuperación de la función pancreática se debe, no solamente a la división de las células β residuales o preexistentes, sino también a la formación de islotes nuevos (neogénesis)[8,13,19] a partir de conductos pancreáticos a través del proceso de transdiferenciación. Durante este evento las células del epitelio ductal se dividen y se diferencian a células endocrinas de los islotes. Para inducir neogénesis en el hámster, Rosenberg y Vinik[21] (1982), envolvieron la cabeza del páncreas con cinta de celofán, con esto hay obstrucción parcial de los conductos y formación de nuevos islotes a partir de ellos. Otro ejemplo es el modelo desarrollado en el ratón por Nora Sarvetnick y su grupo en 1988, en este caso, ratones transgénicos expresan el interferón gamma (INFγ) en las células β, lo cual desencadena una serie de procesos que incluyen la infiltración de linfocitos en los islotes, la destrucción de las células productoras de insulina y la formación de islotes nuevos a partir de los conductos pancreáticos.[13,19,22] Cabe mencionar que en pacientes con diabetes tipo 1 ó 2 no se han encontrado indicios de neogénesis.

Sustancias involucradas en la neogénesis

En la formación de islotes de Langerhans durante el desarrollo embrionario participan varios genes. De ellos, los más estudiados han sido el Pax 4, Pax 6, Pdx 1, islote 1 (isl-l) y el factor nuclear de hepatocitos-3β.[23] Se ha demostrado que el Pax 4 es indispensable para que las células β y δ se diferencien a partir de células precursoras, y que cuando se inactiva dicho gen, las células β y δ no se observan en los islotes y hay un aumento en el número de células α.[24] Asimismo, en la neogénesis de islotes en el ratón transgénico que expresa INFγ, se ha demostrado, mediante técnicas inmunohistoquímicas, que los productos de la expresión de dichos genes están presentes en las células que darán origen a las células endocrinas de los nuevos islotes.[25] Por otra parte, trabajando con el modelo de obstrucción parcial de conductos pancreáticos, Rosenberg y su grupo[19] han aislado una sustancia (s) de origen proteínico de los conductos en diferenciación, a la que han llamado ilotropina, cuya administración a hámsters con diabetes experimental ha revertido el estado diabético hasta en un 60% de los animales, comparado con 10% del grupo control.

Mitógenos de las células β

Es importante mencionar que células de diferentes tejidos pueden depender de sustancias específicas que estimulen el proceso de división celular, por lo que una sustancia que es mitógena en un tejido, puede no tener el mismo efecto en células de otro tejido. Por ejemplo, el factor de crecimiento neural estimula la división celular del tejido nervioso, el epitelio uterino responde a los efectos mitogénicos de los estrógenos, y los mitógenos clásicos de los fibroblastos son el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor α transformante de crecimiento (TGF-α) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas. En islotes cultivados *in vitro* y en estudios *in vivo* llevados a cabo en animales, se ha encontrado que varias sustancias exógenas actúan en las células β estimulando su división; asimismo, se han observado incrementos en los niveles de algunas sustancias endógenas que también son esenciales para su división.[9,14,26,27] Estas sustancias son la glucosa, proteínas, poliaminas y proteína Reg entre otras. Éstas se analizan a continuación.

Glucosa

La glucosa, además de estimular la síntesis y secreción de insulina, también promueve la división de las células β.[14,26,28] La infusión de glucosa durante 96 horas en ratas, da como resultado un aumento selectivo de 50% en el número de células β.[29] En estudios *in vitro* la glucosa ha mostrado un efecto menor pero significativo. Para que dicho carbohidrato ejerza su efecto mitogénico en las células productoras de insulina, debe ser metabolizado, puesto que se ha demostrado que la L-glucosa, D-fructosa y 3-o-metilglucosa no son efectivas, y la administración de manoheptulosa, un inhibidor de la fosforilación de la glucosa, detiene la división celular.[30] Por otra parte, se sabe que las células β responden a la señal mitogénica de la glucosa aumentando el número de las que entran en proceso de división y no por acelerar la duración de su ciclo celular, el cual está estimado en 14.9 horas, subdividido en una fase Gl de 2.5 horas, una fase S de 6.4 horas una fase G2 de 5.5 horas y una fase de mitosis de 0.5 horas.[5,31]

Es importante mencionar que las concentraciones de glucosa utilizadas en cultivos de islotes de Langerhans y las concentraciones medidas en los animales de tales experimentos, comúnmente son mayores a 15 mM (270 mg/dL) y pueden llegar hasta 33.3 mM (600 mg/dL), siendo que la concentración normal es de 5.5 mM (100 mg/dL), y que existen estudios donde se ha demostrado que la hiperglucemia altera a las células β, lo cual se evidencia por la disminución de la insulina secretada y por el aumento en la secreción de proinsulina. Por ejemplo, el cultivar islotes de humano no diabético con altas concentraciones de glucosa (20 mM) durante 10 a 13 días aumenta la cantidad de proinsulina liberada en respuesta a glucosa o a arginina cuando se compara con el grupo control, en el que los islotes son cultivados con glucosa 6 mM.[32] Además, en pacientes con diabetes tipo 2, en quienes predomina un estado de hiperglucemia, no se ha reportado un aumento, sino una disminución en la masa de células productoras de insulina.[33]

Sulfonilureas

Utilizada en el control de pacientes con diabetes tipo 2, la tolbutamida, una sulfonilurea, estimula la división de las células productoras de insulina. Esta sustancia solamente ejerce su efecto mitogénico en presencia de altas concentraciones de glucosa. Si se cultivan las células β con bajas concentraciones de glucosa antes de su exposición a la tolbutamida, se bloquea su efecto mitogénico.[34] Por su parte, la glibenclamida presenta un efecto mitogénico en células β únicamente cuando se administra a animales jóvenes y sólo durante los primeros días de tratamiento.[35]

Leptina

En situaciones fisiopatológicas como la obesidad y en situaciones fisiológicas como el embarazo, las células β deben aumentar su capacidad de producir insulina, puesto que la demanda de esta hormona aumenta proporcionalmente con la ganancia en el peso corporal. En dichas situaciones se ha observado un aumento en el tamaño (hipertrofia) y número (hiperplasia) de células β. Las personas obesas comúnmente presentan resistencia a la insulina, lo cual es *per se* un estímulo para que dichas células aumenten en tamaño y se dividan. Recientemente se encontró que la leptina, hormona secretada principalmente por los adipocitos a fin de suprimir la ingesta de alimentos vía una acción a nivel del hipotálamo,[36] estimula la división de la línea celular RINm5F, derivada de células β.[37] Sin embargo, la concentración utilizada en dicho estudio fue de 100 a 200 nM, una dosis supra-fisiológica, si consideramos que en pacientes obesos la concentración plasmática de leptina es de 1 a 5 nM. Más significativos han sido los resultados obtenidos por Tanabe y col.[18], quienes reportaron que en células de insulinoma de ratón (MIN6), la leptina, en concentraciones de 1 a 5 nM, activa el sistema de proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y ocasiona un aumento en el número de células en división, mientras que el bloqueo de la unión de la leptina a su receptor (ob-R) mediante el inhibidor PD 98059 detiene casi por completo tanto la activación de la MAPK como la proliferación celular. Si esto ocurriera también en células β normales, considerando que presentan receptores a dicha hormona, explicaría mejor la división de las células productoras de insulina en casos de ganancia de peso por obesidad. Sin embargo, en individuos obesos, la alta concentración de ácidos grasos circulantes, si bien es cierto que es un estímulo para la secreción de insulina, puede también alterar a las células β, y junto con la resistencia a la insulina, alterar la secreción de insulina y ocasionar un estado diabético.[38] De hecho, la mayoría (80 a 90%) de los pacientes que desarrollan diabetes tipo 2 son obesos.[39]

Hormona del crecimiento

La hormona del crecimiento (GH), además de favorecer el crecimiento y el metabolismo de las células corporales, mediante acciones anabólicas, lipolíticas y antinatriuréticas,[40] actúa sobre las células β para estimular su división.[9,27] En estudios *in vitro* se ha demostrado que las células β de islotes de Langerhans obtenidos de ratas fetales, neonatas y adultas responden positivamente al estímulo mitogénico de la GH.[9] Esto no ocurre con otras sustancias. Por ejemplo, en la rata, los aminoácidos

estimulan la división de las células β preferentemente en el estado fetal temprano, mientras que la glucosa tiene su efecto mitogénico preferentemente al final de la gestación y durante toda la vida extrauterina.[5,9] En otros tejidos, la GH ejerce sus efectos a través de los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF-I y IGF-II). Investigaciones llevadas a cabo con islotes cultivados *in vitro* parecen demostrar que la administración de la GH resulta en un aumento en IGF-I, y la administración de un inhibidor del IGF-I poco antes de la administración de la GH impide el aumento en el número de mitosis de las células β.[41] Aun cuando estos resultados parecen concluyentes, se han publicado estudios que contradicen la metodología y que concluyen que en las células β, el IGF-1 no es mediador del efecto de la GH.[42] Sin embargo, aunque no fuera por estimulación por la GH, la expresión génica del IGF-I estimula la proliferación de las células β,[43] y la administración concomitante de glucosa más GH e IGF-1 provoca una respuesta aún mayor.[44]

Prolactina y lactógeno placentario

Durante el embarazo, la prolactina (PRL) y el lactógeno placentario (LP, hormona somatomamotropina) estimulan a las glándulas mamarias. En la mujer, por ejemplo, el LP, producido por la placenta, se secreta a partir de la sexta semana del embarazo y alcanza su nivel máximo a término, mientras que la PRL, sintetizada por la adenohipófisis, es secretada desde la octava semana del embarazo, alcanza un pico a término y continúa secretándose durante el periodo de lactancia. Se ha demostrado, en islotes de rata y ratón cultivados *in vitro*, que ambas hormonas estimulan la producción y liberación de insulina, la síntesis de DNA y la división de las células β.[11,41] Sin embargo, mientras que la incorporación de [^{3}H] timidina se lleva a cabo en cuestión de horas, la síntesis de insulina y el aumento en DNA requiere de días en cultivo.[45] Además, en los islotes de Langerhans los receptores a PRL, LP y GH se encuentran únicamente en las células β,[47] por lo que dichas hormonas no tienen el mismo efecto en las células α o δ.

Proteína Reg

Como se mencionó previamente, la pancreatectomía parcial o subtotal activa el proceso de regeneración a partir de la fracción restante del órgano.[10,11] En los animales en los cuales se extirpa 90% del páncreas se inicia la regeneración, pero en aproximadamente 15 días la división de las células β se detiene y dichas células degeneran.[48] Esto puede prevenirse mediante la administración de inhibidores de la poli (ADP-ribosa) sintetasa, como la nicotinamida y la 3-aminobenzamina, en cuyo caso la división celular continúa.[49,50] La poli (ADP-ribosa) sintetasa es una enzima que utiliza el NAD+ celular para sintetizar poli (ADP-ribosa).[48] En este modelo de pancreatectomía subtotal, Okamoto y su grupo identificaron el gen que llamaron Reg (regeneración) en islotes de rata en regeneración.[51] Posteriormente, el gen Reg se aisló y se transfirió a una cepa de *Saccharomyces cerevisae*, donde se expresó eficientemente como un polipéptido de 16 kilodaltones, y su administración *in vitro* e *in vivo* dio como resultado el aumento de figuras mitósicas en las células β de los islotes pancreáticos.[48,52,53] Estudios recientes implican a la proteína Reg en el proceso de neogénesis.[54] Otros estudios en los que se han utilizado hibridación *in situ* y técnicas inmunohistoquímicas, revelan que en ratas normales y en humanos no diabéticos, el producto de dicho gen, la proteína Reg, se sintetiza en los ácinos pancreáticos y no en los islotes.[55,56] Al parecer, la proteína Reg cumple una función diferente, no bien conocida, en la región exocrina del páncreas. Estos estudios revelan que la proteína Reg podría eventualmente ser utilizada en el tratamiento de la diabetes tipo 1, para estimular la división de las células β restantes y así restablecer la función pancreática.

Estudios adicionales señalan la participación de la proteína Reg en la regeneración de la mucosa intestinal,[57] por lo que es posible que la participación de la proteína Reg sea también importante en la regeneración de otros tejidos aún no estudiados.

Litio

En 1921 Banting y Best lograron aislar la insulina. Antes de este acontecimiento tan importante, el litio, uno de los elementos químicos formado por los átomos más pequeños que existen naturalmente, ya era utilizado como agente antidiabético.[58] Recientemente se ha encontrado que además de sus efectos para disminuir la depresión y la manía, tiene efectos mitogénicos sobre las células β,[59] aunque se sabe poco del mecanismo por el cual ejerce tal efecto.

Poliaminas

Las poliaminas son moléculas alifáticas, policatiónicas, derivadas de la L-arginina, que participan en procesos de división, crecimiento y diferenciación celular.[60] Prácticamente todos los organismos presentan poliaminas.[60] Estas sustancias son la putrescina [$NH_2(CH_2)_4NH_2$], la espermidina [$NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$] y la espermina [$NH_2(CH_2)_3NH\ (CH_2)_4NHCH_2)_3NH_2$].[60,61] La síntesis de

putrescina se lleva a cabo por la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), a partir de la ornitina. La putrescina se convierte en espermidina y ésta da origen a la espermina por las sintasas correspondientes. Estas enzimas requieren de S-adenosilmetionina como donadora de un grupo propilamino, por lo cual, en la síntesis de espermidina y espermina se requiere de la acción de la S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC).[5]

A pH fisiológico las poliaminas presentan cargas positivas en sus grupos amino, lo que les confiere la capacidad de interaccionar electrostáticamente. Así, la espermina interacciona con los grupos fosfato del DNA cargados negativamente y participa en su estabilización.[6,60]

Hace ya varias décadas se demostró que la L-arginina comparte con la glucosa la propiedad de estimular la secreción de insulina.[62,63] Posteriormente se encontró que en los islotes pancreáticos las poliaminas se localizan principalmente en los gránulos de secreción de las células β.[64] Sin embargo, se ha demostrado que la arginina estimula la secreción de insulina por una acción a nivel de membrana sin depender de su conversión a poliaminas o a óxido nítrico (NO).[65,66]

La glucosa, hormona del crecimiento (GH), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) más factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1), elevan la concentración de poliaminas intracelulares.[6,67,68] Se ha reportado que la administración de α difluorometilornitina (DFMO), un inhibidor de la ODC, más etilglioxal bis(guanilhidrazona) (EGBG), un inhibidor de la SAM-DC a islotes cultivados *in vitro*, disminuyen la síntesis del mRNA de la insulina y la concentración total de proteínas, lo que se relaciona con una disminución en la concentración de putrescina y espermidina.[69] Sin embargo, la concentración nuclear de poliaminas no disminuye por abajo del grupo control, por lo que es posible que exista una translocación preferente hacia tal organelo.[69] Se ha demostrado también que la administración de inhibidores de la síntesis de las poliaminas no detiene la división de las células β.[70] Es posible que la enzima caseína cinasa 2 sea la transductora de la acción de las poliaminas, pues se sabe que dicha enzima depende de poliaminas, se eleva en respuesta a mitógenos y uno de sus substratos, la oncoproteína Myc, se expresa durante la división celular.[6,70]

Actualmente estamos realizando en nuestro laboratorio estudios sobre el efecto que tienen la L-arginina y las poliaminas sobre la regeneración de las células β pancreáticas, puesto que en estudios previos hemos demostrado que estas sustancias tienden a normalizar tanto la hiperglucemia como la dislipidemia en animales a los que se les ha inducido diabetes experimentalmente.[71-73]

Conclusiones

La regeneración de las células β ha llamado la atención de los investigadores porque podría representar una alternativa terapéutica en el tratamiento de la diabetes mellitus. La formación de nuevas células productoras de insulina resulta de la división de células β preexistentes o bien de diferenciación a partir de conductos pancreáticos, proceso llamado neogénesis. En la neogénesis de las células β participan los productos de genes como el Pax4, mismo que se expresa durante la formación de las células β durante la vida intrauterina.

En modelos animales experimentales la regeneración de las células β ocurre en respuesta a glucosa, hormona del crecimiento, prolactina y factores de crecimiento. Sin embargo, el aumento significativo en la división celular comúnmente requiere de concentraciones farmacológicas, por lo que su utilidad terapéutica aún no es muy clara. Los avances de la investigación en esta área son considerables y se espera que pronto pueda contarse con otros recursos terapéuticos que sin duda ofrecerán mejor calidad de vida para los pacientes diabéticos.

Referencias

1. **Lacy PE.** The pancreatic β-cell. Structure and function. N Engl J Med 1967;276:187-195.
2. **Reaven GM.** Pathophysiology of insulin resistance in human disease. Physiol Rev 1995;75:473-486.
3. **Ferrannini E.** Insulin resistance *versus* insulin deficiency in non-insulin dependent diabetes mellitus: problems and prospects. Endocr Rev 1998;19:477-490.
4. **Atkinson MA, Maclaren NK.** The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1996;331:1428-1436.
5. **Hellerström C, Swenne I.** Functional maturation and proliferation of fetal pancreatic β-cells. Diabetes 1991;40 (Suppl 2):89-93.
6. **Sjöholm, A.** Role of polyamines in the regulation of proliferation and hormone production by insulin-secreting cells. Am J Physiol 1993;264:C501-C518.
7. **Bach J-F.** Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. Endocr Rev 1994;15:516-542.
8. **Logothetopoulos J.** Islet regeneration and neogenesis. In: Freinkel N, editor. Handbook of physiology: Endocrinology. Vol. 1, Baltimore MD, USA: Weverly Press; 1972. p. 67-76.
9. **Sjöholm Á.** Diabetes mellitus and impaired pancreatic β-cell proliferation. J Int Med 1996;239:211-220.
10. **Tanigawa K, Nakamura S, Kawaguchi M, Xu G, Kin S, Tamura K.** Effect of aging on β–cell function and replication in rat pancreas after 90% pancreatectomy. Pancreas 1997;15:53-59.
11. **Hardikar AA, Karandikar MS, Bhonde RR.** Effect of partial pancreatectomy on diabetic status in BALB/c mice. J Endocrinol 1999;162:189-195.
12. **Davidson PM, Campbell LL, Oxbrow L, Hutson JM, Harrison LC.** Pancreatic β-cell proliferation in rabbits de-

monstrated by bromodeoxyuridine labeling. Pancreas 1989;4:594-600.
13. **Gu D, Sarvetnik N.** Epithelial cell proliferation and islet neogenesis in INF-Y transgenic mice. Development 1993; 118:33-46.
14. **Sjüholm A.** Glucose stimulates islet β-cell mitogenesis through GTP-binding proteins and protein kinase C-dependent mechanisms. Diabetes 1997;46:1141-1147.
15. **Otonkoski T, Mally MI, Hayek A.** Opposite effects of β-cell differentiation and growth on Reg expression in human fetal pancreatic cells. Diabetes 1994;43:1164-1166.
16. **Tanabe K, Okuya S, Tanizawa Y, Matsutani A, Yoshimoto O.** Leptin induces proliferation of pancreatic β-cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase. Biochem Biophys Res Commun 1997;241:765-678.
17. **Defazio A, Leary JA, Hedley DW, Tattersall MHN.** Immunohistochemical detection of proliferating cells *in vivo*. J Histochem Cytochem 1987;35:571-577.
18. **Iatropoulos MG, Williams GM.** Proliferation markers. Exp Toxicol Pathol 1996;48:175-181.
19. **Rosenherg L.** Induction of islet cell neogenesis in the adult pancreas: the partial duct obstruction model. Microsc Res Tech 1998;43:337-346.
20. **Debas HT.** Molecular insights into the development of the pancreas. Am J Surg 1997;174:227-231.
21. **Rosenberg L, Vinik AI.** Trophic stimulation of the ductular-islet cell axis: a new approach to the treatment of diabetes. Adv Exp Med Biol 1992;321:95-104.
22. **Sarvetnik N, Liggitt D, Pitts SL, Hansen SE, Stewart TA.** Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class 11 MHC and interferon-X. Cell 1998;52:773-782.
23. **Sander M, German MS.** The β-cell transcription factors and development of the pancreas. J Mol Med 1997;75:327-340.
24. **Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P.** The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing P-cells in the mammalian pancreas. Nature 1997;386:399-402.
25. **Kritzik MR, Krahl T, Good A, Krakowsky M, St.-Onge L, Gruss P, Wright C, Sarvetnik N.** Transcription factor expression during pancreatic islet regeneration. Mol Cell Endocrinol 2000;164:99-107.
26. **Bonner-Weir S.** Regulation of pancreatic β-cell mass *in vivo*. Recent Prog Horm Res 1994;49:91-104.
27. **Bonner-Weir S, Smith FE.** Islet cell growth and the growth factors involved. Trends Endocrinol Metabol 1994;5:60-64.
28. **Kasal M, Ikeuchi M.** Regulation of pancreatic B-cell replication by glucose and some other substances. Biomed Res 1982;3:688-692.
29. **Bonner-Weir S, Deery D, Leahy JL, Weir GC.** Compensatory growth of pancreatic β-cells in adult rats after short-term glucose infusion. Diabetes 1989;38:49-53.
30. **King DL, Kitchen KC, Chick WL.** Pancreatic β-cell replication: relation to insulin secretion. Endocrinology 1978;103:321-327.
31. **Sweene I.** The role of glucose in the *in vitro* regulation of cell cycle kinetics and proliferation in fetal β-cells. Diabetes 1982;31:754-760.
32. **Hostens K, Ling Z, Van Schravendijk C, Pipeleers D.** Prolonged exposure of human cells to high glucose increases their release of proinsulin during acute stimulation with glucose or arginine. J Clin Endocrinol Metabol 1999;84:1386-1390.
33. **Klüppel G, Lühr M, Hablich K, Oberholzer M, Heitz PU.** Islet pathology and pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. Surv Synth Pathol Res 1985;4:110-125.
34. **Popiela H, Moore W.** Tolbutamide stimulates proliferation of pancreatic β-cells in culture. Pancreas 1991;6:664-668.
35. **Guiot Y, Henquin J-C, Rahler J.** Effects of glibenclamide on pancreatic β-cell proliferation *in vivo*. Eur J Pharmacol 1994;261:157-161.
36. **Elmquist JK, Elias CF, Saper CB.** From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. Neuron 1999;22:221-232.
37. **Islam MS, Morton NM, Hansson A, Emilsson V.** Rat insulinoma derived pancreatic beta-cells express a functional leptin receptor that mediates a proliferative response. Biochem Biophys Res Commun 1997;238:851-855.
38. **Ferrannini E.** Insulin resistance *versus* insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. Endocr Rev 1998;19:477-490.
39. **Yates JA, DeFronzo RA.** Metabolic disorders. In: Stein JH, editors. Internal Medicine: diagnosis and therapy. USA: Appleton & Lange; 1993. p. 497-535.
40. **Bengtsoon BA.** The consequences of growth hormone deficiency in adults. Acta Endocrinol 1993;128(Suppl 2):2-5.
41. **Sweene I, Hill DJ, Strain AJ, Milner RDG.** Growth hormone regulation of somatomedin C/insulin-like growth factor 1 production and DNA replication in fetal rat islets in tissue culture. Diabetes 1987;36:288-294.
42. **Billestrup N, Nielsen JH.** The stimulatory effect of growth hormone, prolactin and placental lactogen on β-cell proliferation is not mediated by insulin-like growth factor. Endocrinology 1991;129:883-888.
43. **Smith FE, Rosen KM, Villa-Komaroff L, Weir GC, Bonner-Weir S.** Enhanced insulin-like growth factor 1 gene expression in the regenerating rat pancreas. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:6152-6156.
44. **Cousin SP, Hügl SR, Myers MG, White MF, Reifier-Miller A, Rhodes CJ.** Stimulation of pancreatic β-cell proliferation by growth hormone in glucose-dependent: signal transduction via Janus kinase 2 (JAK2)/signal transduction and activator of transcription 5 (STAT5) with no crosstalk to insulin receptor substrate-mediated mitogenic signaling. Biochem J 1999;344:649-658.
45. **Nielsen JH.** Effects of growth hormone, prolactin, and placental lactogen on insulin content and release, and deoxyribonucleic acid synthesis in cultured pancreatic islets. Endocrinology 1982;110:600-606.
46. **Brelje CT, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, Friesen HG, Sorenson RL.** Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet β-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. Endocrinology 1993; 132:879-887.
47. **Moldrup A, Billestrup N, Nielsen JH.** Rat insulinoma cells express both a 115-kDa growth hormone receptor and a 95-kDa prolactin receptor structurally related to the hepatic receptors. J Biol Chem 1990;265:8686-8690.
48. **Okamoto H.** New aspects to the functioning and regeneration of pancreatic β-cells. Adv Exp Med Biol 1997;426:301-311.
49. **Yonemura Y, Takashima T, Matsuda Y, Miwa K, Sugiyama K, Miyazaki I, Yamamoto H, Okamoto H.** Amelioration of diabetes in partially depancreatized rats by poly (ADPri-

bose) synthetase inhibitors- evidence of islet β-cell regeneration. Diabetes 1984;33:401-404.
50. **Yonemura Y, Takashima T, Matsuda Y, Miwa K, Suglyama K, Miyazaki 1, Yamamoto H, Okamoto H.** Induction of islet β-cell regeneration in partially pancreatectomized rats by poly (ADP-ribose) synthetase inhibitors. Int J Pancreatol 1988;3:73-82.
51. **Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S, Shiga K, Yonemura Y, Tochino Y, Okamoto H.** A novel gene activated in regenerating islets. J Biol Chem 1988;263:2111-2114.
52. **Unno M, Itoh T, Watanabe T, Miyashita H, Moriizumi S, Teraoka H, Yonekura H, Okamoto H.** Islet cell regeneration and Reg genes. Adv Exp Med Biol 1992;321:95-112.
53. **Okamoto H.** The Reg gene family and Reg proteins: with special attention to the regeneration of pancreatic beta-cells. J Hepato-Biliary-Pancreatic Surg 1999;6:254-262.
54. **Anastasi E, Ponte E, Gradini R, Bulotta A, Sale P, Tiberti C, Okamoto H, Dotta F, Di Mario U.** Expression of Reg and cytokeratin 20 during ductal cell differentiation and proliferation in a mouse model of autoimmune diabetes. Eur J Endocrinol 1999;141:644-652.
55. **Watanabe T, Yonekura H, Terazono K, Yamamoto H, Okamoto H.** Complete nucleotide sequence of human reg gene and its expression in normal and tumoral tissue. J Biol Chem 1990;265:3589-3592.
56. **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 β-cell mass. Mol Endocrinol 1991;5:226-234.
57. **Fukui H, Kinoshita Y, Maekawa,T, Okada A, Waki S, Hassan S, Okamoto H, Chiba T.** Regeneration gene protein may mediate gastric mucosal proliferation induced by hypergastrinemia in rats. Gastroenterology 1998;115:1 483-1493.
58. **Salata R, Klein I.** Effects of lithium on the endocrine system: a review. J Lab Clin Med 1987-110:130-142.
59. **Sjöholm A, Welsh N, Rellerstrüm C.** Lithium increases DNA replication, polyamine content, and insulin secretion by rat pancreatic β-cells. Am J Physiol 1992;262:C391-C395.
60. **Pegg AE.** Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. Biochem J 1986;234: 249-262.
61. **Marton LJ, Pegg AE.** Polyamines as targets for therapeutic intervention. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1995;35:55-91.
62. **Floyd JC, Fajans SS, Conn JW, Knopf RF, Rull J.** Stimulation of insulin secretion by aminoacids. J Clin Invest 1966;45:1487-1502.
63. **Edgard P, Rabinowitz D, Merimee TJ.** Effects of aminoacids on insulin release from excised rabbit pancreas. Endocrinology 1969;84:835-843.
64. **Hougaard, DM, Nielsen JH, Larson LI.** Localization and biosynthesis of polyamines in insulin-producing cells. Biochem J 1986;238:43-47.
65. **Smith PA, Sakura H, Coles B, Gummerson N, Proks P, Ashcroft FM.** Electrogenic arginine transport mediates stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic β-cells. J Physiol 1997;499:625-635.
66. **Thams P, Capito K.** L-arginine stimulation of glucose-induced insulin secretion through membrane depolarization and independent of nitric oxide. Eur J Endocrinol 1999; 140:87-93.
67. **Sjüholm A, Weish N, Sandler S, Hellerstrüm C.** Role of polyamines in mitogenic and secretory responses of pancreatic β-cells to growth factors. Am J Physiol 1990;259:C828C833.
68. **Sjöholm A.** Intracellular signal transduction pathways that control pancreatic P-cell proliferation. FEBS Lett 1992;311:85-90.
69. **Welsh N, Sjöholm A.** Polyamines and insulin production in isolated mouse pancreatic islets. Biochem J 1988;252: 701-707.
70. **Welsh N.** A role for polyamines in glucose-stimulated insulin-gene expression. Biochem J 1990;271:393-397.
71. **Méndez JD, Zarzoza E.** Inhibition of platelet aggregation by L-arginine and polyamines in alloxan treated rats. Biochem Mol Biol Int 1997;43:311-318.
72. **Méndez JD, Palomar-Morales M.** Prevention by L-arginine and polyamines of delayed development and embryotoxicity caused by chemically induced diabetes in rats. Reprod Toxicol 1999;13:501-509.
73. **Méndez JD, Balderas F.** Regulation of hyperglucemia and dyslipidemia by exogenous L-arginine in diabetic rats. Biochimie 2001;83(5):453-458.

ELSEVIER

Archives of Medical Research 35 (2004) 114–120

Archives of Medical Research

ORIGINAL ARTICLE

Regeneration of β-Cells and Neogenesis From Small Ducts or Acinar Cells Promote Recovery of Endocrine Pancreatic Function in Alloxan-Treated Rats

Roberto De Haro-Hernández,[a] Lourdes Cabrera-Muñoz[b] and José D. Méndez[a,c]

[a]*Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Metabólicas,* [b]*Departamento de Patología Anatómica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN-SXXI), IMSS, Mexico City, Mexico*
[c]*División de Posgrado e Investigación, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico*

Received for publication February 10, 2003; accepted October 20, 2003 (03/024).

Background. We previously showed by using biochemical parameters that male Sprague-Dawley rats receiving a single intraperitoneal (i.p.) administration of alloxan (120 mg/kg body weight) with no further treatment recovered endocrine pancreatic function after 12 days.

Methods. Male Sprague-Dawley rats received an i.p. injection of alloxan (120 mg/kg body wt), were killed at 3, 6, 9, or 12 days ($n = 7$), and their capacity to recover endocrine function was evaluated by means of a) biochemical parameters, which included glucose, triglyceride, and total cholesterol measurements and b) nuclear incorporation of 5′-bromodeoxyuridine (BrdU) by β and acinar cells as well as presence of neogenesis from either ductal or acinar cells using double-staining BrdU-insulin immunohistochemical technique.

Results. Three days after receiving a single i.p. administration of alloxan, rats showed increase in serum glucose, triglyceride, and total cholesterol concentrations, reaching levels of 542.4 ± 63.1, 907.6 ± 154.9, and 106.0 ± 2.7 mg/dL (mean ± standard deviation [SD]), respectively. At this time, increase in β-cell replication was also observed, although this reached maximum by day 6 ($p < 0.001$). Replication was also present in acinar cells, but these cells showed their maximum at day 3 ($p < 0.001$) and subsequently decreased, as did β-cells, almost steadily to normal values by day 12. Neogenesis of β-cells was observed mainly as transdifferentiation from acinar cells at day 3 and from ductal cells at day 6, after which it tended to be normal.

Conclusions. Male Sprague-Dawley rats receiving a single i.p. alloxan dose tended to normalize their endocrine function by day 12 after alloxan administration. This process included both regeneration and neogenesis of pancreatic β-cells from either ductal or acinar cells. © 2004 IMSS. Published by Elsevier Inc.

Key Words: β-cell, Alloxan, Regeneration, Neogenesis, Ductal cells, Rat.

Introduction

Formation of new pancreatic β-cells is carried out in two ways: proliferation of preexisting β-cells, called regeneration, and transdifferentiation of non-β-cells from either ductal or acinar cells, called neogenesis (1–3). This latter process occurred normally during fetal development and gave rise to islets of Langerhans; in addition, it involved activation of specific genes and differentiation of epithelial cells from small ducts into endocrine cells (4,5). Once formed, islet β-cells regenerated although slowly through life to maintaining a number of insulin-producing cells able to contribute to maintaining homeostasis (2,6).

Address reprint requests to: Dr. José D. Méndez, Unidad de Investigación en Enfermedades Metabólicas, CMN-SXXI, IMSS, P.O. Box A-047, 06703 México, D.F., México. Phone: (+52) (55) 5627-6900, ext. 1400; FAX: (+52) (55) 5761-0952; E-mail: mendezf@servidor.unam.mx

0188-4409/04 $–see front matter. Copyright © 2004 IMSS. Published by Elsevier Inc.
doi: 10.1016/j.arcmed.2003.10.001

Several animal models were developed to study neogenesis, which can occur even in adult age, as does wrapping of pancreas in the hamster (7), transgenic expression of γ-interferon, whose expression is controlled by the insulin promoter (8), and glucose infusion to mildly diabetic rats (9). Neogenesis in these models appears to occur as follows: first, division of ductal epithelial cells occurred and then these expressed insulin; afterward, they began migrating to form islet-like cell clusters near ducts, which were thought to continue adding newly formed endocrine cells until completely new islets were formed (9,10).

Some substances selectively destroyed pancreatic β-cells (11,12). Alloxan is a diabetogenic substance used to induce experimental diabetes for >50 years, and it usually was accepted that this type of induced diabetes prevailed for a long period (13–15). Early reports, however, showed that alloxan-induced diabetes was not permanent but regressed steadily in several laboratory animals including rat and mouse (16–18). More recently, it was published that, in diabetic mouse model induced by alloxan after clamping superior mesenteric artery to achieve selective damage of a certain area of pancreas while sparing another, neogenesis of β-cells was present in the damaged region and regeneration in the spared region during the following days (19), although total recovery from diabetes lasted much longer.

We previously showed by biochemical parameters that Sprague-Dawley rats treated with alloxan dose of 120 mg/kg body weight (BW) recovered from diabetic state during the following 12 days (20). To what extent recovery of endocrine pancreatic function was due to regeneration and neogenesis in this rat model is not yet known; therefore, considering that diabetogenic insults triggered mechanisms that attempted to reestablish normal pancreatic function, this study aimed at identifying to what extent regeneration and neogenesis participated in recovery of endocrine pancreatic function in these animals and whether acinar cells also divided during this time period.

Materials and Methods

Chemicals. Alloxan monohydrate and 5-bromo-2′-deoxyurdine (BrdU) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Mouse anti-BrdU monoclonal antibody, guinea pig anti-insulin polyclonal antibody, link antibodies, peroxidase-conjugated streptavidin label, and streptavidin alkaline phosphate label, as well as kits to detect activity of peroxidase and alkaline phosphatase by reaction with diaminobenzidine and new fuchsin, respectively, were from BioGenex (San Ramon, CA, USA). All other chemicals were of analytical grade.

Animals. Adult male Sprague-Dawley rats weighing 300 ± 10 g were used in this study. Rats were kept in the animal facility of the Twentieth Century National Medical Center in Mexico City under standard housing conditions with water and food available ad libitum and with a 12 h: 12 h light/dark cycle, with lights turned on at 06:00 h.

Diabetes induction. Alloxan solution (1.25 mol/L) was prepared by dissolving 0.5 g alloxan in 2.5 mL 0.154 M NaCl. The volume solution was adjusted according to weight of rats (36 mg/180 μL alloxan solution per 300 g/rat). After a 12-h fasting period, animals received intraperitoneally (i.p.) a single alloxan dose of 120 mg/kg BW in saline solution between 9 A.M. and 10 A.M., considered as day 0 of treatment and groups of seven rats were killed at days 3, 6, 9, or 12 after alloxan administration. Body weight was registered during the study.

Biochemical tests. Rats were anesthetized with 50 mg/kg BW ketamine and 10 mg/kg BW xylazine injected intramuscularly (i.m.). Blood from abdominal aorta was collected in test tubes and allowed to clot and then centrifuged at 1,500 × *g* in a Beckman CS-12R centrifuge to obtain serum, which was used to determine glucose by method of Trinder (21), by which glucose is oxidized by glucose-oxidase into gluconic acid and hydrogen peroxide, followed by the reaction of hydrogen peroxide with 4-aminophenazone and phenol catalyzed by phenol oxidase to produce a complex dye registered at 540 nm. Cholesterol was measured enzymatically by cholesterol oxidase (22). Total cholesterol concentrations were proportional to the dye product formed for reaction of hydrogen peroxide release with 4-aminophenazone and phenol reagent, measured at 540 nm. Triglycerides were measured using the method of Wahlefeld (23). This method is based on triglyceride hydrolysis by lipase, and glycerol formed is utilized by glycerol kinase, phosphoglycerol oxidase, and peroxidase to form hydrogen peroxide, which reacts with 4-aminophenazone and 4-chlorophenol to produce a complex that measured at 620 nm. Pancreas was excised and placed in 10% buffered formalin.

Immunohistochemical analyses. To determine BrdU-labeling index, interpreted as number of β-cells incorporating BrdU percent, rats received BrdU i.p. at a dose of 50 mg/kg BW 4 h prior to being killed. BrdU-labeling index was calculated by counting 1,000 insulin-stained cells from two tissue sections of pancreas including head, body, and tail according to the following formula: BrdU-labeling index = number of double-stained cells × 100/1,000. Double-stain immunohistochemical technique was carried out according to standard protocols (8,24): briefly, paraffin blocks were prepared and 4- to 5-μm sections were obtained using a Leika microtome: sections were deparaffinized by placing them in a laboratory stove at 70°C for 20 min and 10 min in xylol, after which they were rehydrated in decreasing concentrations of alcohol and phosphate-buffered saline (PBS).

The first immunodetected antigen was BrdU, which required antigen retrieval; for this purpose, sections were

placed in 2 N hydrochloric acid and kept at 70°C for 15 min. Afterward, the reaction was stopped with 0.1 mol/L sodium borate and left for 20 min in PBS. Tissue sections were incubated for 45 min with hydrogen peroxide and the same time with the blocking agent, 3 h with mouse anti-BrdU monoclonal antibody, 45 min with biotinylated goat anti-mouse antibody (link antibody), and 45 min with streptavidin-peroxidase complex. Finally, peroxidase activity was visualized with diaminobenzidine under light microscopy, and the reaction was stopped by rinsing with PBS. Subsequently, avidin and biotin were applied sequentially for 45 min each.

For immunohistochemical insulin detection, tissue sections were incubated with blocking agent, guinea pig anti-insulin polyclonal antibody, biotinylated rabbit anti-guinea pig antibody (link antibody), and streptavidin-alkaline phosphatase complex for periods of 45 min each, and alkaline phosphatase activity was identified using new fuchsin under light microscopy. Subsequently, tissue sections were counterstained with Harris hematoxylin, dehydrated in increasing concentrations of alcohol, and allowed to dry before mounting with glycerin jelly and sealing slide borders with nail polish.

Statistical analysis. Results were analyzed by using ANOVA test for independent samples.

Results

Body weight and biochemical parameters. Body weight, glucose, triglycerides, and total cholesterol were measured at 3, 6, 9, and 12 days in both control and alloxan-treated animals. There were significant differences in body weight between alloxan-treated and control groups ($p < 0.05$). Initial and final weights were 303.1 ± 12.8–344.5 ± 17.8 and 303.7 ± 13.2–289.2 ± 21.4 g (mean ± SD) for control and diabetic groups, respectively. Glucose, triglyceride, and total cholesterol levels were similar to those previously reported by our laboratory (20). Briefly, mean serum glucose concentration was 128.6 ± 6.4 mg/dL in control group, while it was 542.4 ± 63.1 mg/dL on day 3 in alloxan-treated group ($p < 0.05$) and steadily decreased to normal values on day 12. Serum cholesterol and triglycerides showed a similar pattern to glucose, reaching levels of 106.0 ± 2.7 and 907.6 ± 154.9 mg/dL (mean ± SD), respectively, on day 3 and decreasing thereafter (Table 1).

Table 1. Mean ± SD of glucose, triglycerides, and cholesterol in serum of normal and alloxan-treated rats[a]

Time (days)	Glucose	Triglycerides	Total cholesterol
0	128.6 ± 6.4	65.3 ± 7.5	65.4 ± 6.3
3	542.4 ± 63.1[b]	907.6 ± 154.9[b]	106.0 ± 2.7[b]
6	247.5 ± 12.8[b]	234.4 ± 9.0[b]	95.1 ± 5.8[b]
9	154.7 ± 11.5	77.4 ± 3.9	68.7 ± 3.2
12	136.0 ± 7.8	68.1 ± 5.1	69.7 ± 4.5

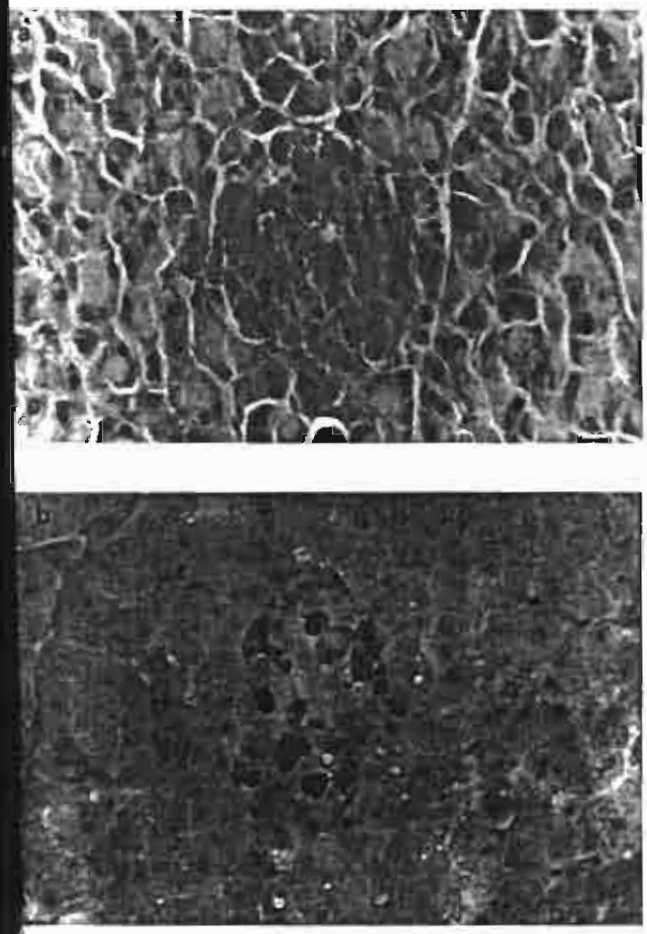
[a]Concentration is expressed as mg/dL. Each value is mean ± SD of seven determinations. Diabetes was induced with alloxan (120 mg/kg i.p.); [b]Significant differences at $p < 0.001$ compared to the control group.

β-Cell regeneration and neogenesis. Insulin was well detected immunohistochemically in β-cells of normal and alloxan-damaged islets (Figures 1a and b). Rats killed 3 days after alloxan administration showed increased BrdU-labeling index in islet β-cells (Figures 2a and 3) and acinar cells (Figures 2b and 4). However, this did not mean that there was a remarkably higher number of β-cells in some islets but a higher number of islets showing regeneration, although two BrdU-stained β-cells could rarely be seen in the same islet. Acinar cells, on the other hand, showed maximum increase ($p < 0.001$) at day 3 (Figure 4). This increase was in accordance with a higher number of individual extra-islet β-cells scattered throughout acinar cells (Figure 2c), which can be thought of as β-cells arising through transdifferentiation from acinar cells although it could also be due to certain damage of alloxan caused directly on acinar cells. Also noteworthy was the fact that only in one rat was BrdU-labeling index of the acinar cells increased (not shown). This animal, however, showed increased regeneration of islet β-cells and ductal cells. Surprisingly, in this rat the complete process of neogenesis through transdifferentiation of ductal cells could be appreciated (Figure 5), i.e., replication and insulin expression by ductal cells and β-cell clusters near a small duct.

At day 6, islet BrdU-labeling index increased even more ($p < 0.001$) (Figure 6a) and acinar BrdU-labeling index remained elevated. In addition, a focal region was observed (Figure 6b), which showed increased number of ducts. The focal region presented increased number of BrdU-stained cells and a well-formed entire islet. Focal regions were not found at any other time during this study. On day 9, replication of β-cells diminished ($p < 0.05$) as compared to day 6 (Figure 3), while that of acinar cells remained high (Figure 4), and no extra-islet β-cells were found appearing either from small ducts or among acinar cells. Finally, 12 days after alloxan administration, BrdU-labeling indexes of β- and acinar-pancreatic cells were similar to the control group.

Discussion

We showed an increase in regeneration of preexisting β-cells and neogenesis mainly from acinar cells to form new β-cells at days 3 and 6 after a single alloxan administration in male Sprague-Dawley rats. This is in accordance with results from biochemical parameters previously reported by our laboratory in which Sprague-Dawley rats treated with the same alloxan dose and with no further treatment recovered from diabetic state and completely reestablished pancreatic endocrine function after 12 days (20). Results of this study agreed with those of Lazarow (17), who reported in 1952 that serum glucose returned to normal levels in a rat receiving four subthreshold doses i.v. of alloxan (30 mg/kg BW). However, Lazarow found that rats receiving i.v. 100



gure 1. Changes shown in pancreas of rat: a) islet from a normal rat, d b) islet from a diabetic control rat 24 h after alloxan injection (120 g/kg i.p.). Insulin and BrdU were detected by double immunohistochemi- l stain technique with new fuchsin and diaminobenzidine, respectively 0×).

g/kg BW took >1 year to recover from diabetes. Other pers published prior to 1970 also studied recovery from abetes in several animal species. More recently, Waguri al. (19) found that in diabetic mouse model induced by lective perfusion of alloxan after clamping the mesenteric tery, damaged pancreatic region showed neogenesis and ndamaged region showed regeneration, reaching full re- very from diabetes after 1 year. Interestingly, these investi- tors noted maximum incorporation of BrdU on day 5 of eir study. Apparently, however, our results had a point disagreement with those reported by other researchers, o stated that the diabetic state in alloxan-treated ani- als extended for several months or even years. Such differ- ces are perhaps explained by the fact that we administered e alloxan dose i.p. rather than intravenously (i.v.); further- ore, when alloxan was administered i.p., doses as high as 0 mg/kg BW were used (25). In our experience, when a se >120 mg/kg of nonoxidized alloxan was used, hyper- ycemia was severe. For instance, glucose levels >500 mg/

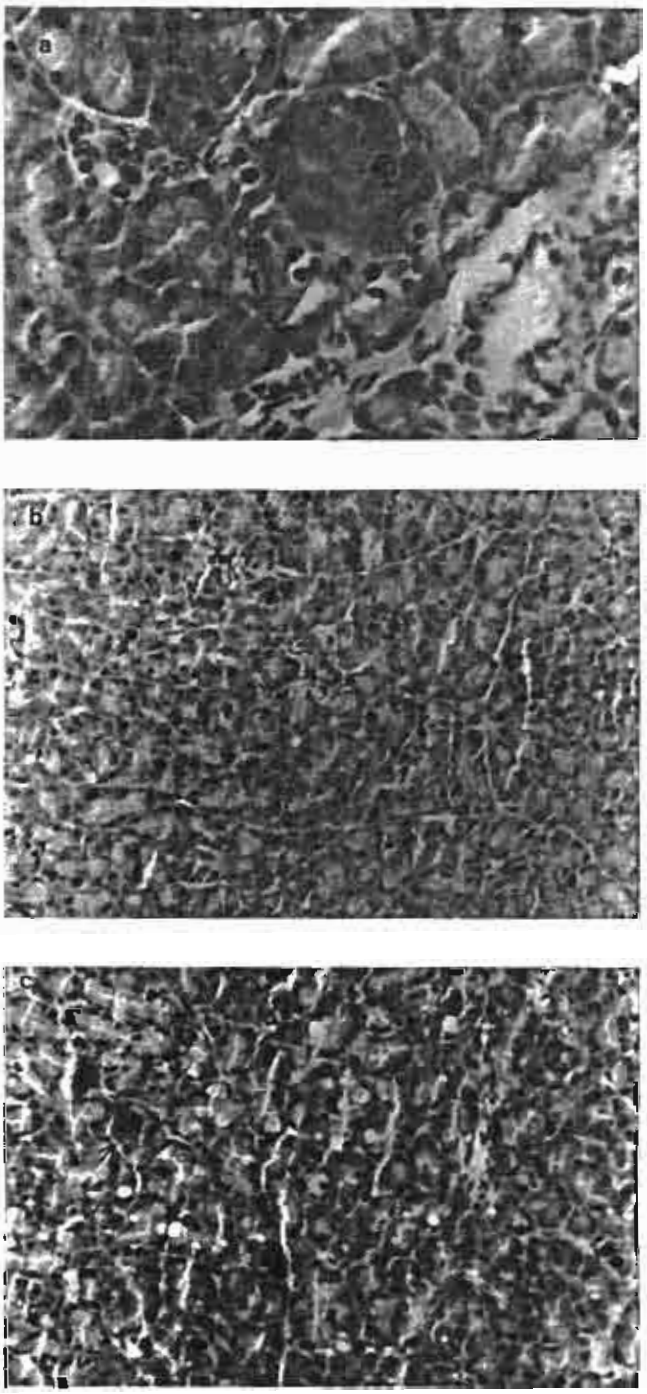


Figure 2. Changes shown at day 3 after alloxan administration and double immunohistochemically stained with new fuchsin and diaminobenzidine to detect insulin and BrdU: a) incorporation of BrdU into nucleus of a β-cell (arrows) (40×); b) acinar cells showing incorporation of BrdU (arrows) 20×, and c) neogenic β-cells arising from acinar cells (arrows) (20×).

dL were reached in a 24-h time period when a single alloxan dose of 180 mg/kg BW was administered, but death rate among treated rats increased considerably.

The increase noted in islet β-cell regeneration in rats killed on day 3 (Figure 2) could explain why serum glucose

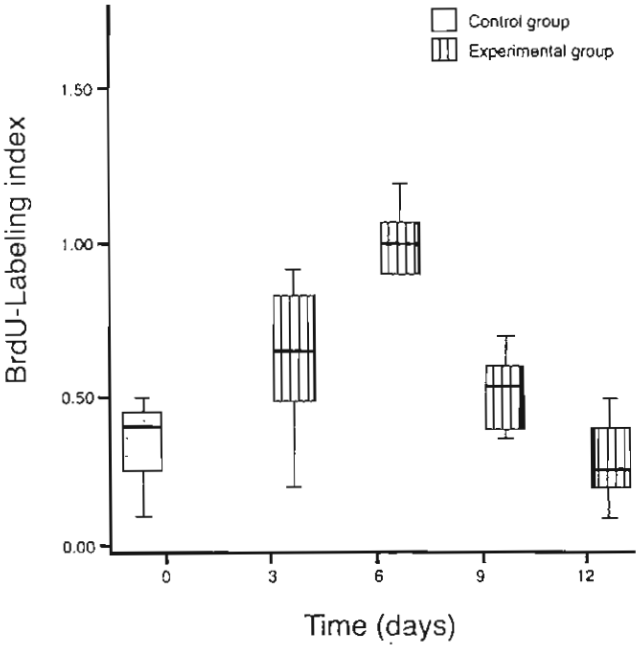


Figure 3. BrdU-labeling index of β-cells at days 3, 6, 9, or 12 after alloxan administration (120 mg/kg i.p.) (mean ± SD, $n = 7$).

concentration diminished after day 6 in alloxan-treated rats. Neogenesis of β-cells through differentiation of acinar cells was amply documented (26,27), and acinar cells were even proposed as precursors of ductal cells in focal regions, which can differentiate into β-cells. The marked increase in

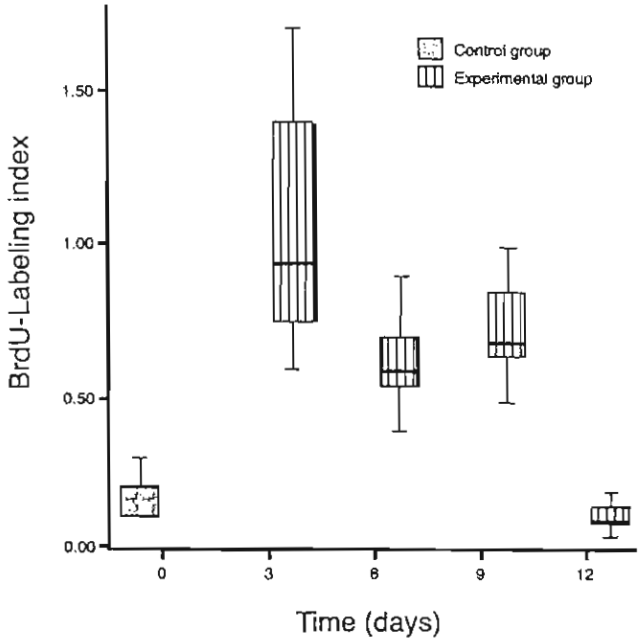


Figure 4. BrdU-labeling index of acinar cells at days 3, 6, 9, or 12 after alloxan administration (mean ± SD, $n = 7$). Acinar cells were counted on the same preparations used to count islet β-cells.

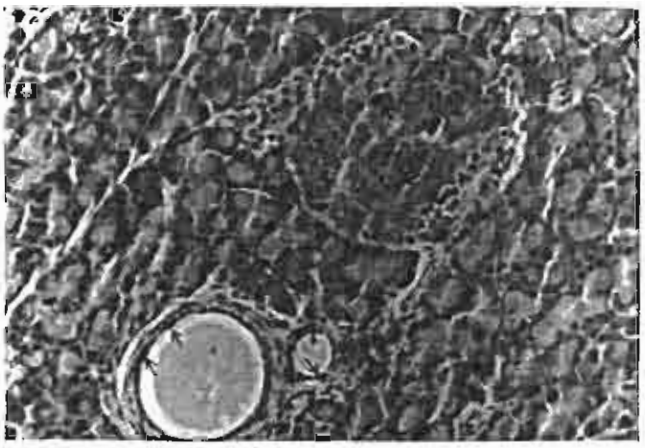


Figure 5. Neogenic β-cells arising from ductal cells at day 3. BrdU-stained cells can be seen in both ducts (large arrows), an insulin-expressing ductal cell is clearly shown (short arrow), and three extra-islet β-cells are evident near the smaller duct (arrowhead). In addition, a complete islet showing incorporation of BrdU by β-cells can be observed (gross arrows) (20×).

acinar cells we found on day 3 could be explained if we think of acinar cells as the ultimate providers of cells that will become β-cells, although we cannot rule out that alloxan also damaged them, causing their replication. On the other hand, it was recently shown that new β-cells arose from intra-islet precursor cells in streptozotocin-treated mice, increasing considerably in number in only 1 week (28). Similar results were obtained in rat and human islets cultured *in vitro* (29). Our study does not discard the possibility that intra-islet, BrdU-stained β-cells proceeded from similar precursor cells, which could be plausible.

All processes that participated in reestablishing the normal amount of β-cells after insult were present in alloxan-treated rat. Of these, the most prevalent was transdifferentiation, although we were sufficiently fortunate to capture the entire process of neogenesis through transdifferentiation of ductal cells in addition to the regeneration process in a single photomicrograph. It has been known that alloxan can be taken up by other cells in addition to β-cells (30). The possibility does exist that at least in part, increase in BrdU-labeling index noted in acinar cells could be due to a certain degree of damage caused in such cells, but also as we have already noted to provide or replace acinar cells that will become extra-islet β-cells. In this study, although we observed neogenesis of β-cells from small ducts in only one rat and therefore it could be insufficient to conclude that there was significant participation of this process in overall recovery of endocrine pancreatic function, these results suggest that neogenesis in this manner can occur.

Molecular mechanisms that trigger and control regeneration and neogenesis processes are yet to be known; however, it is clear that certain molecules such as the reg protein (31) and others (1,3,32) are involved. This model could be useful

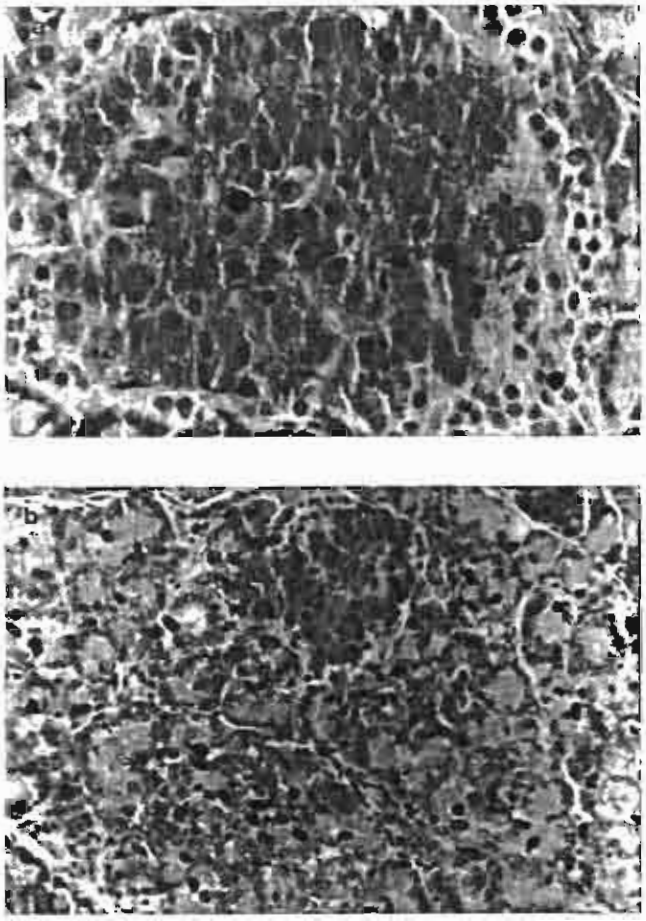


Figure 6. Changes shown 6 days after alloxan administration: a) β-cells showing nuclear incorporation of BrdU (arrows) (20×), and b) a focal region in which multiple ductules present a high number of immunohistochemically BrdU-stained cells (arrows) (20×). In this focal region, an islet can be seen.

for studying expression of specific substances during regeneration and neogenesis, processes by which the endocrine pancreas recovers its normal function after diabetogenic insult.

These results showed the high adaptability of endocrine pancreas to damage and the potential capacity that remained in exocrine pancreas to reestablish homeostasis after the endocrine function of this gland was challenged. Even so, it is interesting to note that focal regions are not abundant in alloxan-treated rats at the concentration we used, because we noted only a single focal region in only one animal at day 6 in this study. This is not sufficient for establishing quantitative differences between focal region and remainder of the pancreas.

In conclusion, we found that regeneration of β-cells and neogenesis mainly from acinar cells occurred in alloxan-treated Sprague-Dawley rats. These appeared to be at least in part mechanisms by which altered biochemical parameters turned toward normality within a 12-day period of time after single i.p. alloxan administration. These biochemical and immunohistochemical results support our previous observations with regard to recovery of pancreatic endocrine function in this experimental model.

Acknowledgments

This study was supported by grants FP-0038/731 and IMSS-2002/223 from the Mexican Institute of Social Security (IMSS) and grant FP-0314 from Laboratorios Silanes, S.A. de C.V. RDH-H is a Conacyt (México) doctoral fellow (registration #91707).

References

1. Bonner-Weir S, Smith FE. Islet cell growth and the growth factors involved. Trends Endocrinol Metabol 1994;5:60–64.
2. Bonner-Weir S. β-cell turnover, its assessment and implications. Diabetes 2001;50(Suppl 1):S20–S24.
3. Rosenberg L. Induction of islet cell neogenesis in the adult pancreas: the partial duct obstruction model. Microsc Res Tech 1998;43:337–346.
4. Kritzik MR, Krahl T, Good A, Krakowsky M, St.-Onge L, Gruss P, Wright C, Sarvetnik N. Transcription factor expression during pancreatic islet regeneration. Mol Cell Endocrinol 2000;164:99–107.
5. Kritzik MR, Jones F, Chen Z, Krakowsky M, Krahl T, Good A, Fox H, Sarvetnick N. PDX-1 and Msx-2 expression in the regenerating and developing pancreas. J Endocrinol 1999;163:523–530.
6. Sjöholm Å. Diabetes mellitus and impaired pancreatic β-cell proliferation. J Int Med 1996;239:211–220.
7. Rosenberg LA, Brown RA, Duguid WP. A new approach to the induction of duct epithelial hyperplasia and nesidioblastosis by cell cellophane wrapping of the hamster pancreas. J Surg Res 1983;35:63–72.
8. Gu D, Sarvetnik N. Epithelial cell proliferation and islet neogenesis in IFN-γ transgenic mice. Development 1993;118:33–46.
9. Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE. A second pathway for regeneration of the adult exocrine and endocrine pancreas: a possible recapitulation of embryonic development. Diabetes 1993;42:1715–1720.
10. Gu D, Lee M-S, Krahl T, Sarvetnick N. Transitional cells in the regenerating pancreas. Development 1994;120:1873–1881.
11. Rerup CC. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. Pharmacol Rev 1970;22:485–518.
12. Jorns A, Munday R, Lenzen S. Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated pancreatic islets *in vitro*. J Endocrinol 1997;155:283–293.
13. Hadzija M, Lipovac V, Gavella M, Rocic B, Slijepcevic M. Concentration of sialic acid in alloxan diabetic rat islets of Langerhans. Cell Mol Biol 1992;38:613–619.
14. Thurstun JH, McDougal DB Jr, Hauhart RE, Schulz DW. Effects of acute, subacute, and chronic diabetes on carbohydrate and energy metabolism in rat sciatic nerve. Relation to mechanisms of peripheral neuropathy. Diabetes 1995;44:190–195.
15. Battell ML, Yuen VG, Verma S, McNeill JH. Other models of type I diabetes. In: McNeill JH, editor. Experimental models of diabetes. Boca Raton, FL, USA: CRC Press;1999. pp. 219–229.
16. Waisbren BA. Alloxan diabetes in mice. Proc Soc Exp Biol Med 1948;67:154–156.
17. Lazarow A. Spontaneous recovery from alloxan diabetes in the rat. Diabetes 1952;1:363–372.
18. Bunnang SC, Warner EN, Bunnang S. Effect of alloxan on the mouse pancreas during and after recovery from diabetes. Diabetes 1967;16:83–89.
19. Waguri M, Yamamoto K, Miyagawa J-I, Tochino Y, Yamamori K, Kajimoto Y, Nakajima H, Watada H, Yoshiuchi I, Itoh N, Imagawa A, Matsuzana Y. Demonstration of two different processes of β-cell

regeneration in a diabetic mouse model induced by selective perfusion of alloxan. Diabetes 1997;46:1281–1290.
20. Méndez JD, Balderas F. Regulation of hyperglycemia and dyslipidemia by exogenous L-arginine in diabetic rats. Biochimie 2001;83:453–458.
21. Trinder P. Determination of glucose in blood using oxidase with alternative oxygen acceptor. Ann Clin Biochem 1969;6:24–27.
22. Katterman R. Rapid determination of total and free cholesterol in serum. Clin Chem Clin Biochem 1984;22:245–249.
23. Wahlefeld AM. Triglycerides, determination after enzymatic hydrolysis. In: Bergmeyer HU, editor. Methods of enzymatic analysis 2nd ed. Vol. 4. New York: Academic Press;1974. pp. 1831–1835.
24. Davidson PM, Campbell IL, Oxbrow L, Hutson JM, Harrison LC. Pancreatic beta cell proliferation in rabbits demonstrated by bromodeoxyuridine labeling. Pancreas 1989;4:594–600.
25. Kodama T, Iwase M, Nunoi K, Maki Y, Yoshinari M, Fujishima M. A new diabetes model induced by neonatal alloxan treatment in rats. Diabetes Res Clin Prac 1993;20:183–189.
26. Bouwens L. Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet β-cells in the pancreas. Microsc Res Tech 1998; 43:332–336.
27. Gu D, Arnush M, Sarvetnick N. Endocrine/exocrine intermediate cells in streptozotocin-treated Ins-IFN-γ transgenic mice. Pancreas 1997;15: 246–250.
28. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Müler B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate *ex vivo* into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. Diabetes 2001; 50:521–533.
29. Guz Y, Nasir I, Teitelman G. Regeneration of pancreatic β cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. Endocrinology 2001;142:4956–4968.
30. Malaisse WJ, Doherty M, Ladriere L, Malaisse-Lagae F. Pancreatic uptake of [2-^{14}C]alloxan. Int J Mol Med 2001;7(3):311–315.
31. Zenilman ME, Chen J, Magnuson TH. Effect of Reg protein on rat pancreatic ductal cells. Pancreas 1998;17:256–261.
32. Wang RN, Rehfeld JF, Nielsen FC, Kloppel G. Expression of gastrin and transforming growth factor-α during duct to islet cell differentiation in the pancreas of duct-ligated adult rats. Diabetologia 1997;40:887–893.