



Naturalis

Repositorio Institucional

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar>

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Naturales y Museo



Histofisiología del páncreas endocrino de la rata en un modelo de envejecimiento normal y un modelo diabético espontáneo

Riccillo, Fernando L.

Doctor en Ciencias Naturales

Dirección: Cónsole, Gloria M.

Co-dirección: Ronderos, Jorge R.

Facultad de Ciencias Naturales y Museo

2007

Acceso en:

<http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20120126000029>



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional

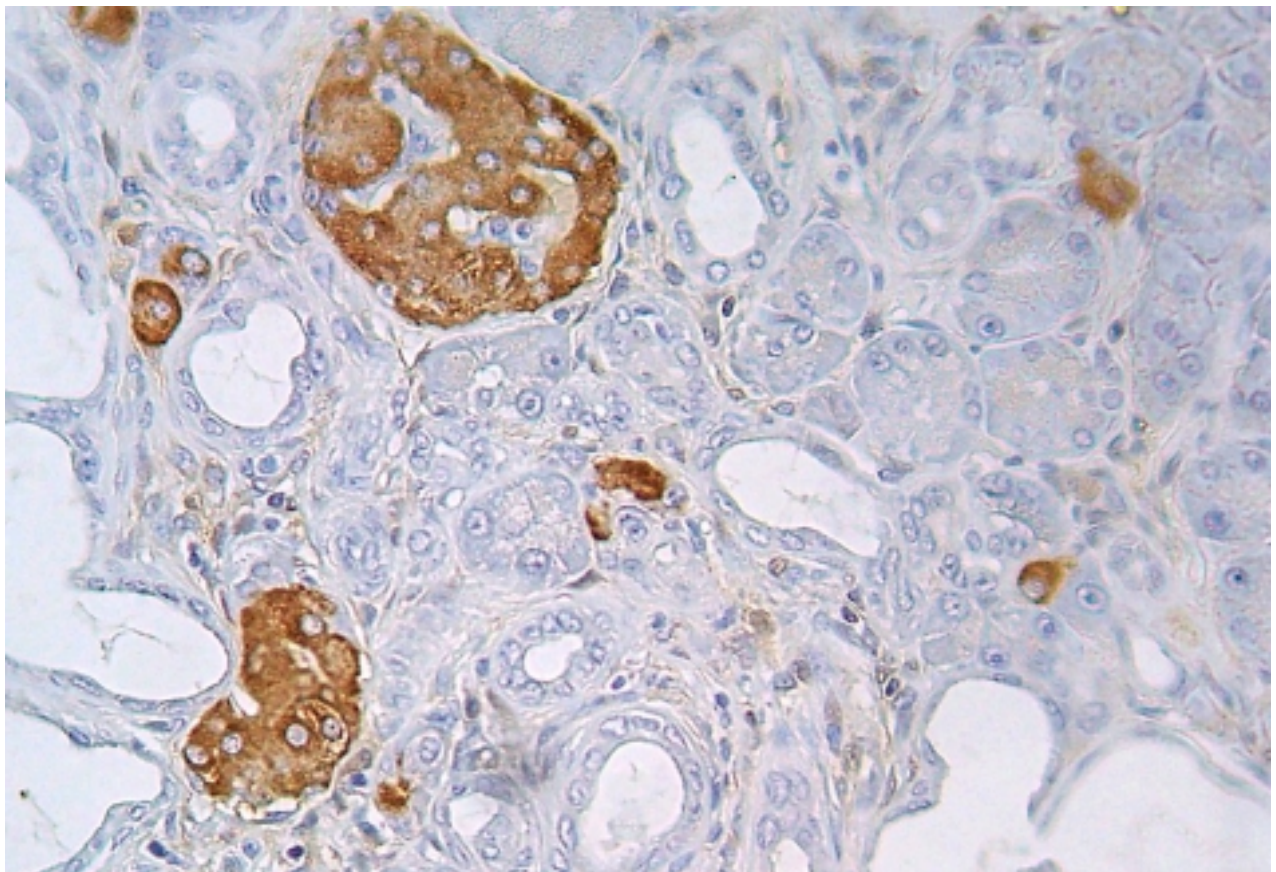


Naturalis

Repositorio Institucional
FCNyM - UNLP



Histofisiología del páncreas endocrino de la rata en un modelo de envejecimiento normal y un modelo diabético espontáneo.



Tesis Doctoral
Fernando L. Riccillo

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



**Histofisiología del páncreas endocrino de la
rata en un modelo de envejecimiento
normal y un modelo diabético espontáneo.**

Tesis Doctoral
Lic. Fernando L. RICCILLO

DIRECTOR: Prof. Dra. Gloria M. Cónsole
CO-DIRECTOR: Prof. Dr. Jorge R. Ronderos

2007

AGRADECIMIENTOS	1
ABREVIATURAS	2b
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
1. Generalidades sobre envejecimiento. Homeostasis y estrés	5
• Teorías	6
- A. Teorías moleculares	6
- B. Teorías celulares	8
- C. Teorías sistémicas	10
• Reloj biológico	11
2. Estructura y morfología del páncreas	15
• Desarrollo ontogenético	15
• Origen y diferenciación de las células insulares	17
• Mecanismos y eventos inductivos de la citodiferenciación pancreática	18
• Formación de los islotes de Langerhans	20
• Histoarquitectura del islote	21
- Tipos celulares endocrinos	21
- Irrigación de los islotes	24
- Inervación de los islotes	25
3. Fisiología del páncreas endocrino	26
• Síntesis y secreción de la insulina	27
4. Diabetes mellitus (DM)	31
• Definición y características de la DM	31
• Clasificación de las distintas formas de DM	32
- DM tipo 1	32
- DM tipo 2	33
• Posibles mecanismos involucrados en la alteración de la secreción y/o acción de la insulina en la DM tipo 2.	35
- Alteración de la secreción de insulina	35
- Resistencia a la insulina	36
• Principales parámetros en la regulación morfológico-funcional del páncreas endocrino.	37
• Modelos animales utilizados para el estudio de la DM	40
- Rata eSS	41
- Rata eSMT	42
OBJETIVOS	43

MATERIALES Y MÉTODOS	45
• Animales	45
• Estudios morfológicos	46
- Procesamiento histológico	46
- Inmunohistoquímica	46
- Análisis morfométrico	47
• Estudios plasmáticos	48
• Análisis estadístico	49
 RESULTADOS	 50
1. Envejecimiento en ratas normales (Sprague Dawley)	50
• Estudios morfológicos	50
- Análisis morfométrico	53
- Replicación y diferenciación de las células endocrinas	56
• Estudios plasmáticos	57
- Niveles de glucosa e insulina	57
- Niveles de colesterol y triglicéridos	58
- Niveles de TBARS	59
2. Envejecimiento en ratas diabéticas (eSMT)	61
• Estudios morfológicos	61
- Análisis morfométrico	62
- Replicación y diferenciación de las células endocrinas	64
• Estudios plasmáticos	66
- Niveles de glucosa e insulina	66
- Niveles de colesterol y triglicéridos	68
- Niveles de TBARS	69
 DISCUSIÓN	 70
1. Envejecimiento en ratas normales (Sprague Dawley)	70
2. Envejecimiento en ratas diabéticas (eSMT)	79
 CONCLUSIONES	 87
 BIBLIOGRAFÍA	 90

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Cs. Médicas y a la Facultad de Cs. Naturales por haberme permitido desarrollar el presente trabajo de tesis.

A la Dra. Cónsole por haberme posibilitado realizar el presente trabajo y por haberme dado todo lo que estuvo a su alcance durante mis años de becario.

Al Doc por su invaluable aporte en mi formación y por haberme transmitido tantas enseñanzas y sobre todo su pasión por la observación y las imágenes.

Al Dr. Gagliardino por haberme permitido realizar los Radioinmunoensayos de insulina en su laboratorio del CENEXA.

A la gente de la Facultad de Cs. Médicas de Rosario, por su buena onda y por brindarme su confianza y la posibilidad de utilizar sus animales en este trabajo.

A Mary y a Celia (además de ser dos fenómenos) por su mano exquisita en la técnica histológica y por todos los buenos momentos compartidos.

A Gaby por toda su paciencia y su sabiduría del idioma anglosajón y sobre todo por su incondicional disposición, siempre.

A Anita por su incondicional apoyo, su eterna paciencia y los buenos momentos, mil gracias.

A Rodolfo y a Yoli por su permanente disposición y colaboración en mis tareas de laboratorio.

Al personal de la Cátedra de Histología B de Medicina, por su buena onda y los tantos momentos compartidos.

A las chicas de Histología A por su buena onda y dejarme utilizar su laboratorio para confeccionar las últimas fotos de la tesis.

A Rubén (CENEXA) por su increíble disposición y buena onda con los RIA de insulina.

A Fede por su incondicional disposición, aun desde el extranjero.....

Al terapéutico laboratorio 1.....por todos los momentos vividos..... en su memoria....

Y a vos Jorgito, por haberme dado siempre tu más sincera opinión, por haberme bancado durante todos estos años y haber confiado en mí, más allá de todas las peripecias del largo camino recorrido, por enseñarme gran parte de lo que hoy llevo en mi haber como biólogo y sobre todo por tu amistad.

Finalmente....., a mi familia y a mis amigos, que han estado siempre, en las buenas y en las no tan buenas, durante todos estos años de idas y venidas con mi tesis a cuestas (y las demás "cositas"....) y que de una u otra forma se convirtieron en una parte fundamental de este proceso. Gracias por estar.....y seguir estando.

Al Mar..... por todas las maravillosas experiencias vividas y por ser, año a año, mi principal fuente de energía e inspiración.....

ABREVIATURAS

aa	autoanticuerpo
ADP	adenosin difosfato
AG	ácido graso
AGE	productos de glicosilación avanzada
AMPc	adenosin monofosfato cíclico
AR	área de referencia
AR _e	área de referencia endocrina
AR _t	área de referencia total
ATP	adenosin trifosfato
CAT	catalasa
CK	citoqueratina
CL	colesterol
DC	densidad de células
DM	diabetes mellitus
DV	densidad de volúmen
GABA	ácido gama-amino butírico
GK	cepa Goto Kakizaki
GLUT-	transportador de glucosa
GPx	glutación peroxidasa
H ₂ Od	agua destilada
IL-	interleukina
INF- γ	interferón gama
IR	insulino-resistencia
J	jóven
OLETF	cepa Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty
PBS	solución buffer fosfato
PCNA	antígeno nuclear de proliferación celular
PE	páncreas endocrino
PQ	proteín-quinasa
RGB	sigla de la norma de color: Red-Green-Blue
S	senil
SD	cepa Sprague Dawley
SOD	superóxido dismutasa
TBARS	sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TG	triglicéridos
TGF- β	factor de crecimiento transformante beta
TNF- α	factor neurotrófico transformante alfa
V	viejo
ZDF	cepa Zucker diabética y obesa (Zucker Diabetic Fatty)
ZF	cepa Zucker obesa no diabética (Zucker Fatty)

RESUMEN

El paso del tiempo ocupa un lugar de importancia en el conjunto de factores que alteran la fisiología del páncreas. Sin embargo, resulta difícil analizar el efecto del envejecimiento, aislado de las posibles patologías y cambios degenerativos que se asocian con la edad avanzada. Se sabe que el incremento de la edad está asociado, tanto en ratas como en humanos, a un descenso en la tolerancia a la glucosa, como así también a una disminución en la secreción de insulina y/o a estados de insulino-resistencia. La Diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica, representada por un grupo de alteraciones aparentemente heterogéneas, cuya característica común es la hiperglucemia. Estudios previos demostraron que la rata eSMT desarrolla espontáneamente un síndrome diabético tipo 2 relacionado con una obesidad moderada, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa y niveles de insulina elevados, que se acentúa con la edad y es más severo en animales machos.

El objetivo de nuestro trabajo fue comparar la evolución del páncreas endocrino durante la vida de dos cepas murinas, una normal (Sprague Dawley) y una diabética espontánea (eSMT) a través del estudio de diferentes variables morfológicas y plasmáticas, con el propósito de analizar las alteraciones observadas en dichas líneas y aportar nueva información referente al desarrollo de la patología diabética tipo 2.

En el presente estudio se utilizaron ratas macho de 4, 24 y 30 meses de edad de una cepa normal (Sprague Dawley); y de 2, 5, 10, 14 y 18 meses de una línea diabética espontánea (eSMT). Los individuos fueron mantenidos a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, bajo un ciclo de 12/12 horas luz / oscuridad con una dieta estándar y agua ad libitum. Los páncreas extraídos fueron fijados en líquido de Bouin para su posterior procesamiento para microscopía de luz (HyE, tricrómico de Gomori e inmunohistoquímica). Para análisis específicos, los cortes histológicos se inmunomarcaron para la detección de insulina, glucagón, somatostatina, PP y antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), mediante el empleo de anticuerpos primarios comerciales y anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa o fosfatasa alcalina. Para los estudios morfométricos se utilizó un sistema de videomicroscopía digital (software Optimas®) para el cálculo de la densidad de volumen (DV) de las diferentes poblaciones endocrinas. Los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos y colesterol se analizaron mediante kits comerciales, mientras que la insulina se midió por radioinmunoensayo (RIA).

Si bien la alteración más evidente en ambas cepas, estuvo representada por el avance de la fibrosis intersticial, existieron profundas diferencias cuando se analizó la porción parenquimática afectada, el momento de su aparición, progresión y magnitud de la misma. Mientras que en las ratas normales estos cambios se observaron en las edades avanzadas (ratas viejas y seniles) a nivel del parénquima exocrino, en las ratas diabéticas el componente fibrótico comenzó a desarrollarse en los primeros meses de vida, especialmente sobre el componente endocrino, a través de tabiques intrainculares, alterando la integridad de los islotes. Asociado a estas estructuras fragmentarias se observaron focos de hiperplasia adenomatosa y quística de células ductales, acúmulos pigmentarios (hemosiderina) y otros tipos celulares intersticiales. En cuanto a la masa endocrina, la cepa normal mostró una relativa estabilidad, más allá del aumento compensador en la población B. En la cepa diabética eSMT se observó un abrupto descenso desde edades tempranas (5 meses), llegando casi a desaparecer en los animales de 18 meses. La presencia de figuras mitóticas y/o PCNA positivas insulares y ductales fue casi nula en las ratas SD. Las ratas diabéticas mostraron en cambio, evidencias de proliferación celular en los animales de 2 meses, resultando frecuente además la presencia de células ductales positivas para insulina en los animales de mayor edad.

A nivel plasmático, la cepa normal sólo mostró cambios significativos en la insulinemia de los animales seniles y en los valores de colesterol plasmático de los animales más viejos. La rata eSMT, por el contrario, mostró un aumento en los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol asociados a un marcado descenso en la insulinemia.

Si bien las ratas normales no mostraron cambios significativos en la proporción de la masa endocrina, las variaciones en la DV de la población B, podrían obedecer a una inercia compensadora vinculada a una menor capacidad de secreción de insulina con la edad. En cuanto a la rata eSMT, el temprano desarreglo observado en la histoarquitectura pancreática, conjuntamente con la disminución progresiva del tejido endocrino y las alteraciones metabólicas descriptas, ocasionarían un irreversible estado patológico que imposibilita la supervivencia de los animales más allá de los 18 meses de edad. Resta aun dilucidar las causas asociadas con estas severas alteraciones, sobre todo las vinculadas con el avance de la fibrosis y su posible asociación con el descenso de la masa endocrina, siendo posible la mediación de algún proceso inmunológico inespecífico en el desarrollo de dicha patología.

INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES SOBRE ENVEJECIMIENTO. Homeostasis y estrés.

La homeostasis depende de un complejo conjunto de mecanismos que permiten regular y mantener un equilibrio dinámico dentro de un sistema ante los diferentes cambios en las condiciones externas e internas. Dichos cambios que alteran la condición homeostática se definen como estrés. Cuanto mayor sea la capacidad de respuesta de estos mecanismos al estrés, mayor será la posibilidad de adaptación y supervivencia de un organismo (Quay, 1995).

Una característica común del ciclo de vida, de virtualmente todos los organismos, es la progresiva declinación en la eficiencia de los mecanismos homeostáticos una vez que han superado la etapa reproductiva (Sohal y Weindruch, 1996).

Los organismos procariotas, como las bacterias, no evidencian un deterioro semejante al de los organismos superiores, simplemente dejan de existir como tales al momento de dividirse por fisión, dando origen a dos nuevos, que perpetúan la constitución génica de la cepa a la que pertenecen. Estos organismos serían desde un punto de vista biológico potencialmente inmortales, dependiendo exclusivamente de las condiciones del ambiente (nutrientes, pH, temperaturas extremas, etc.) para multiplicarse indefinidamente. No obstante, trabajos recientes sugieren que las bacterias sufrirían un deterioro diferencial, cuestionando la creencia generalizada de su indefinida capacidad replicativa. Estos estudios sostienen que las células hijas no son idénticas, sino que serían funcionalmente asimétricas luego de dividirse, por lo que su descendencia sufriría un progresivo deterioro, manifestado en el descenso de su tasa de crecimiento (Stewart, y col. 2005).

Si bien esto confirmaría la inexistencia de organismos inmortales, y que la senescencia sería un proceso inherente a la vida misma, aparentemente el proceso de envejecimiento de los organismos más simples (procariotas y algunos protozoos) no sería equivalente al de los organismos multicelulares más complejos (Cui y col., 2000).

Así, el envejecimiento representa el destino inexorable de aquellos organismos que sobreviven a una muerte accidental durante su existencia. En el caso de los organismos que se reproducen sexualmente, una vez maduras sus células germinales, prolongan su vida durante un tiempo para poder reproducirse. Luego, inician una declinación progresiva e irreversible.

Numerosas estrategias y modelos experimentales han sido utilizados para intentar comprender la naturaleza de los mecanismos que subyacen al fenómeno de la senescencia. Como consecuencia han surgido diferentes teorías que intentan explicar cómo y por qué envejece un organismo, evidenciando de esta manera, la compleja y multifactorial esencia de este proceso (McClearn, 1997; Semsei, 2000; Timiras, 1995).

Teorías

Innumerables hipótesis sobre el tema han sido analizadas hasta el presente, aunque desafortunadamente ninguna de ellas por si misma parece brindar la respuesta exacta al problema. Generalmente, cada una de éstas focaliza la cuestión sobre un elemento de este complejo sistema, desde el cual intentan explicar la esencia del envejecimiento.

Los diferentes niveles de análisis sobre las bases del envejecimiento, han llevado a clasificar las distintas teorías en función del nivel de organización sobre el cual se enmarca cada una de ellas.

Así, de acuerdo a los criterios actuales podríamos referirnos a teorías *moleculares, celulares y sistémicas*.

A. Teorías moleculares

Estas se basan en la estabilidad del genoma y la fidelidad de la transferencia de la información genética (Kanugo, 1970) y suponen que las variaciones en la expresión de los genes, particularmente de algunos de ellos, determina las distintas etapas en la vida de los organismos.

a1. Mutación y reparación del ADN:

Diferentes factores físicos, químicos y biológicos actúan continuamente sobre todas las células de un organismo, alterando en mayor o menor medida la estructura de su ADN, como por ejemplo: radiación UV, radiación ionizante, diversas sustancias químicas propias de los alimentos y del medio ambiente y numerosos agentes endógenos como aldehídos, especies reactivas del oxígeno y otros radicales libres derivados de las diferentes rutas metabólicas. Sumado a ello, el ADN también puede sufrir daños en su estructura a través de reacciones químicas espontáneas, como las debidas a hidrólisis, metilación, desaminación, glicosilación, etc. Además, se agregan a estos factores los errores en los mecanismos de control habitual sobre el proceso de replicación del ADN.

Diversos sistemas de reparación del ADN responden intentando corregir los daños

en su estructura. La insuficiente respuesta de los mecanismos reparativos o la falla en alguno de éstos, conduciría a alteraciones en la estructura genética y por consiguiente en la síntesis de proteínas, alterando las funciones y la sobrevivencia celular. Es así como se ha relacionado la habilidad para reparar el ADN, y la estabilidad de su estructura, con la sobrevivencia de los organismos (Vijg y col., 1993; Vijg, 2004). Teniendo en cuenta que el ADN mitocondrial es mucho más susceptible al daño que el ADN nuclear, el incremento de dichas alteraciones a nivel de las mitocondrias, ha sido relacionado con el envejecimiento y con muchas de las enfermedades asociadas con la edad avanzada como el cáncer, la diabetes y las enfermedades neuro-degenerativas como el Alzheimer y el Parkinson (Wallace, 1999).

a2. Error – catástrofe:

Esta hipótesis plantea el deterioro sobre la base del error en los mecanismos de transcripción (ADN → ARN) y/o traducción (ARN → proteínas) que, incrementados a lo largo del tiempo, conducirían a un “error catástrofe” y a la muerte celular (Orgel, 1963).

No obstante, la existencia de proteínas específicas que se expresan en células expuestas a diferentes tipos de estrés (acidez, altas temperaturas, sustancias tóxicas, etc.), plantea un nuevo capítulo en el metabolismo proteico, modificando de esta forma el criterio de esta última hipótesis. Estas proteínas denominadas de shock térmico (*heat shock proteins*), intervendrían en el control sobre el plegamiento y la organización de la estructura proteica. Aparentemente, la expresión de estas proteínas disminuiría con la edad (Fargnoli, 1990).

a3. Regulación génica:

Los estudios realizados en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) en los que se describe la existencia de genes aparentemente relacionados con la longevidad, han sentado las bases sobre la genética del envejecimiento. Aunque no son demasiados los genes identificados hasta ahora, éstos han sido descriptos también en levaduras (Jazwinski, 1993, 1996), y en nematodos (*Caenorhabditis elegans*) (Johnson, 1990, 1997), entre otros. La variación de la expresión de estos genes estaría relacionada, por un lado, con el metabolismo antioxidante en el caso de la mosca de la fruta y los nematodos (*age-1*, *daf-2*), y también, con el número de ciclos de división celular, en el caso de las levaduras (*LAG1*), manifestando en ambos una clara incidencia sobre la longevidad de estos organismos.

Estos genes estarían involucrados además en la regulación de otros genes asociados al crecimiento, diferenciación y proliferación celular denominados *proto-oncogenes*, como por ej. el *c-fos* y el *ras*.

B. Teorías celulares

Estas teorías relacionan los cambios asociados al envejecimiento que ocurren a nivel de la estructura y función celular.

b1. Capacidad proliferativa limitada / teoría de los telómeros

Esta hipótesis se basó en estudios realizados por Hayflick (1961, 2003), en cultivos de fibroblastos humanos. Se observó que estas células se dividían unas 50 veces, aproximadamente, pero poco a poco iban disminuyendo su capacidad proliferativa hasta que morían. La duración limitada de la vida de las células en cultivo, ha sido observada no sólo en fibroblastos sino también en otras poblaciones celulares como queratinocitos, hepatocitos, células nerviosas y fibras musculares lisas. Sólo aquellas poblaciones celulares en las que se induce una transformación, adquieren una capacidad ilimitada para dividirse.

Existe otro tipo celular que parece escapar a esta generalidad: las células germinales, que junto con las demás células madres, representan un conjunto permanente para cada población celular.

El mecanismo que limita la división celular de aquellas poblaciones que sufren división, es tal vez el mismo que limita la capacidad funcional de las más especializadas, que no se dividen. La gran mayoría de los investigadores creen que la respuesta a esta limitante reside en la constitución genética y la regulación de su expresión. Esta hipótesis planteada por Hayflick (1961, 2003), encuentra en la *teoría de los telómeros* un pilar fundamental en la explicación de esta capacidad replicativa diferencial, más allá de la incidencia de otros factores reguladores de la división celular. Esta teoría sostiene que el número de divisiones que una célula puede alcanzar está determinado, entre otras cosas, por la longitud de sus *telómeros* (extremos de cada cromosoma que estabilizan la molécula de ADN). Estos, están constituidos por pequeñas secuencias de ADN ricas en guanina, repetidas cientos de veces, y permiten que la porción codificante de los mismos se duplique completamente. Sin embargo, en cada división celular se pierden varios nucleótidos por cromosoma, o sea que los telómeros se acortan con cada ciclo de división de la célula. Parece ser que la expresión de la enzima responsable de la síntesis y preservación de estas secuencias de ADN, denominada *telomerasa*, está relacionada con el tipo celular y por lo tanto con la capacidad replicativa de éstas. Así, las células

somáticas, que no expresan esta enzima, se dividen un número limitado de veces, mientras que las células madres o stem, como así también las células transformadas o tumorales, en las que se ha detectado la presencia de esta enzima, lo pueden hacer potencialmente de forma indefinida (Blackburn, 1990; Blackburn, 2001; Prescott y Blackburn, 1999; Sedivy, 1998; Collins, 2000).

b2. Usar – descartar (*wear and tear*) y Tasa metabólica (*rate living*)

De acuerdo con estas teorías los organismos serían como máquinas, en las que a medida que el uso de sus partes se incrementa, éstas se alteran en su estructura y luego en su función, ocasionando fallas progresivas (Sacher, 1977). Sin embargo, los organismos, a diferencia de las máquinas, tienen una cierta capacidad de reparar sus errores. Aparentemente el ritmo de este proceso (uso y desgaste) determinaría la longevidad de las diferentes especies. De esta manera, ésta última teoría estaría directamente relacionada de forma inversa con el rango o tasa metabólica (Sohal, 2002). Así, según esta hipótesis, a medida que el metabolismo basal aumenta, la acumulación de errores y diferentes moléculas producto de dicha actividad metabólica (radicales libres) se incrementaría, y como consecuencia, el deterioro celular y orgánico se aceleraría, disminuyendo la expectativa de vida.

Según la visión de Kirkwood (1987, 2002), un organismo no envejece y muere como consecuencia de la imposibilidad de reparar los errores acumulados, sino más bien porque el costo reparativo sería mayor que el propio beneficio. Dicho de otra forma, sería menos “costoso” un *soma desechable* que un organismo eternamente joven. Esta teoría plantea que es más eficiente invertir toda la energía en la etapa reproductiva, que derrochar dicha energía en mantener un soma indefinidamente.

b3. Radicales libres

Esta teoría postula que ciertos compuestos altamente reactivos (radicales libres) producidos como consecuencia del metabolismo oxidativo, están relacionados con el envejecimiento celular y los desórdenes asociados con esta etapa de la vida (Harman, 1956, 1981). Los radicales libres son especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, por lo que resultan sumamente reactivos. Las células producen en forma continua radicales libres de oxígeno como subproductos del metabolismo aeróbico y como derivados de las reacciones oxidativas del sistema endocítico. La reducción de uno o dos electrones del oxígeno produce el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) respectivamente. Ambos, en presencia de metales de transición libres (hierro y cobre principalmente) originan una molécula extremadamente reactiva: el radical hidroxilo ($-OH$). Actualmente se

asume que este radical es el responsable del inicio de la destrucción oxidativa de las biomoléculas (lípidos de membranas, proteínas y ADN), con la consecuente desestabilización del metabolismo celular (Beckman *y col.*, 1998).

Como contraparte, existe en las células una variedad de sustancias que evitan el ataque de estos radicales sobre los componentes celulares. El conjunto de estas moléculas protectoras se denomina sistema antioxidante. Algunas, como las vitaminas E y C, actúan secuestrando radicales libres. Otras son enzimas que catalizan la conversión de dichas moléculas en otras menos nocivas. Por ejemplo, la enzima superóxido dismutasa convierte el anión superóxido en H_2O_2 y oxígeno molecular (O_2). Luego el H_2O_2 es convertido en H_2O y O_2 por otras enzimas como la catalasa y otras peroxidasas (glutación peroxidasa - GPx), removiendo de esta forma los precursores del radical $\cdot OH$, responsable final del daño celular. Así, se ha demostrado que el deterioro celular se correlaciona tanto con una disminución en la expresión de estas enzimas como con el aumento del metabolismo aeróbico, dándole soporte de esta manera, a la teoría de la tasa metabólica referida en párrafos previos.

b4. Entrecruzamiento molecular

Muchas moléculas desarrollan puentes o uniones con otras moléculas. Con el tiempo, estas interacciones se incrementan, alterando su estructura y función específica (Bjorksten, 1968).

La glucosa es un ejemplo de este tipo de moléculas. Mediante su acción reductora sobre los grupos amino libres de las proteínas, genera productos de glicosilación temprana (también denominados de Amadori) que culminan, luego de una serie de reacciones no del todo conocidas, con la formación y acumulación de formas moleculares complejas e irreversibles denominadas productos de glicosilación avanzada (AGE, *Advanced Glycosylation End Products*) (Cerami, 1987; Mc Carthy, 1995; Vlassara, 2003) alterando y modificando la estructura y función de las proteínas involucradas. En concreto, niveles elevados de azúcares en el organismo en forma sostenida ocasionarían la acumulación de AGE con la consiguiente alteración de los tejidos a lo largo del tiempo.

C. Teorías sistémicas (Teoría Neuroendocrina)

Estas teorías consideran que el envejecimiento es consecuencia del deterioro progresivo de los componentes principales en los sistemas de control y regulación del organismo.

La teoría neuroendocrina plantea que la disminución de la capacidad

homeostática del organismo durante el envejecimiento compromete la adaptabilidad y supervivencia del mismo. Esta capacidad de respuesta, tanto a estímulos externos como internos, depende de los diferentes mecanismos de integración, tales como los sistemas nervioso, endocrino e inmunológico.

Esta teoría en particular se concentra en los sistemas nervioso y endocrino como ejes regulatorios del organismo. Walford (1974) incluye además al sistema inmune en el esquema de la regulación sistémica.

Reloj biológico

Poco tiempo después que se produce la concepción de un nuevo individuo, se inicia la expresión de un nuevo genoma que contiene la información necesaria para definir cada una de las distintas etapas del desarrollo y en qué momento tendrá lugar cada una de las mismas.

A este mecanismo se lo suele definir como *reloj biológico*, es decir, la secuencia ordenada de cambios que ocurren durante la vida de un organismo. Lo fascinante de este mecanismo es la capacidad intrínseca de dirigir el delicado equilibrio del desarrollo desde la propia estructura de una única célula que se irá transformando hasta dar origen a un nuevo organismo. Mucho se ha discutido sobre si existe una o más estructuras que controlen este mecanismo. Algunos sugieren al hipotálamo como un probable sitio responsable de esta compleja regulación en el estado post-embrionario (Samorajski, 1977), aunque todavía permanece oscuro el espacio reservado a estas respuestas, y si existe una única estructura que controle tan complejo mecanismo.

Sin embargo, sería el ritmo de este reloj biológico el que determinaría la duración de las diferentes etapas de la vida. Existen enfermedades en las que pareciera haberse detectado una marcada alteración en el ritmo de este mecanismo. Un ejemplo es el denominado síndrome de Cushing, en el que se manifiesta una excesiva producción de corticoides por las glándulas suprarrenales. Esta disfunción parece no deberse a una falla en las propias glándulas suprarrenales, sino más bien a alteraciones a nivel neurohipofisario, con la consecuente secreción descontrolada de adenocorticotrofina (ACTH). La consecuencia de ello traería aparejada una serie de trastornos propios de la senectud.

Otro caso es el de la *progeria*. Esta es una extraña patología hereditaria, que se desarrolla en niños de 5 o 6 años de edad, en los que comienzan a manifestarse evidentes síntomas de senilidad (pérdida del cabello, arrugas en la piel, pérdida de vitalidad, etc.), a un ritmo tal, que difícilmente alcanzan los 20 años.

Así, cualquiera sea la hipótesis considerada, es necesario que se tenga en cuenta al menos tres condiciones fundamentales:

- Los organismos sufren una progresiva e irreversible declinación fisiológica en la etapa post-reproductiva de la vida.
- La expectativa de vida varía entre las diferentes especies.
- La restricción calórica retrasa la manifestación de los cambios asociados al envejecimiento (a través de la reducción del estrés metabólico/oxidativo) y prolonga el promedio de la máxima edad en los animales.

Más allá de los diferentes niveles de incidencia de cada uno de los aspectos considerados, es evidente que el conjunto de dichos factores, están asociados, de una u otra forma, con el proceso del envejecimiento.

Los sistemas de control (nervioso y endocrino) del organismo ofrecen un buen modelo para el estudio de los aspectos asociados al envejecimiento, debido a la declinación que sufren en su funcionamiento y regulación durante el mismo. Ambos sistemas, están íntimamente asociados, tanto desde el punto de vista funcional como estructural, por lo que se suelen establecer diferentes “ejes” de regulación en el organismo, constituidos de acuerdo al siguiente esquema: sistema nervioso central (SNC)– hipotálamo → hipófisis → glándula endocrina → órgano blanco (Fig.1).

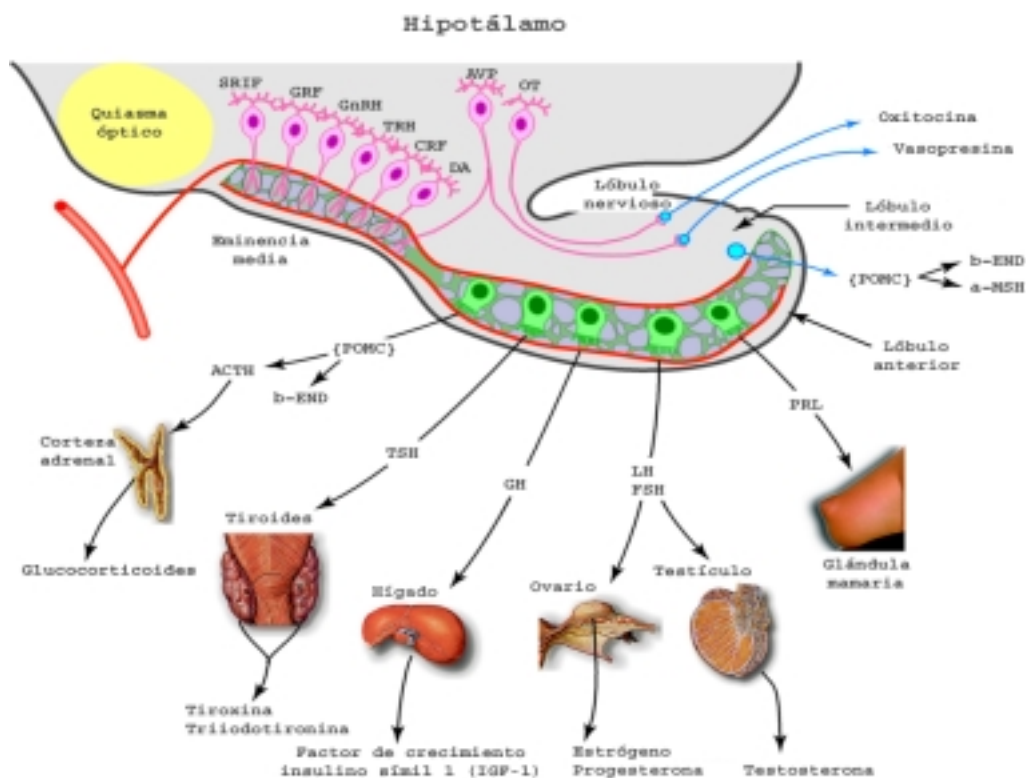


Figura 1. Principales ejes de regulación neurohipofisiotróficos.

Sin embargo, no todo el conjunto del sistema neuroendocrino está organizado de acuerdo al esquema descripto. Además, cada vez resulta más dificultoso establecer una independencia de cada eje, dada la compleja interrelación que existe entre los mismos.

El *páncreas* es un ejemplo de una glándula endocrina sobre la que resulta difícil establecer un eje regulatorio definido, debido a la ausencia de una única hormona o péptido a nivel central o neurohipofisario, que posea una acción directa y específica sobre dicho órgano.

No obstante, dada su importancia en la regulación del metabolismo general, sumado al estricto control de su funcionamiento, resulta de interés profundizar en el análisis de los probables cambios sufridos por el *páncreas* durante el envejecimiento, como así también, sus posibles causas y los mecanismos involucrados en el desarrollo de dichas alteraciones, tanto a nivel de su estructura histológica como de los diferentes parámetros plasmáticos asociados con su fisiología.

A nivel plasmático, dos de los parámetros más empleados como indicadores de oxidación y envejecimiento son los AGE (Cerami *y col.*, 1987; McCarthy, 1995) y las denominadas sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Los primeros, están en relación con el metabolismo de la glucosa y han cobrado un creciente interés en la última década. Su formación, como ya se ha explicado, se debe a un proceso que se inicia como consecuencia de una glicosilación no enzimática de las proteínas (fundamentalmente las de vida media larga) que, luego de una serie de reacciones, culmina con la formación de estructuras moleculares complejas e irreversibles (AGE). En concreto, niveles elevados de glucosa (hiperglucemia) en forma sostenida ocasionarían la acumulación de AGE y una consiguiente alteración de los tejidos.

En cuanto a los TBARS, representan uno de los marcadores de peroxidación lipídica endógena más utilizados, en estudios asociados a envejecimiento y estrés oxidativo. La peroxidación lipídica, por su parte, es una de las consecuencias de la acción de los radicales libres directa o indirectamente a través de especies oxígeno-reactivas. Aunque existen numerosos estudios que intentan correlacionar la peroxidación de lípidos con las edades avanzadas, los resultados son diversos y contradictorios (Rikans, 1997).

Como contraparte, a nivel tisular, las lipofuscinas/hemosiderinas constituyen productos de acumulación metabólica en células post-mitóticas, formados por diferentes sustancias químicas, principalmente lipoproteínas y carbohidratos,

parcialmente oxidados (Terman and Brunk, 1998). Estos pigmentos se acumulan habitualmente con la edad, dependiendo su aumento de la especie y del tipo celular. Comúnmente, también se los denomina pigmentos del envejecimiento. Se ha comunicado recientemente sobre la colocalización intracelular de AGE y lipofuscinas mediante técnicas inmunohistoquímicas (Horie *y col.*, 1997; Horie *et al*, 1997).

2. ESTRUCTURA Y MORFOLOGÍA DEL PÁNCREAS

El páncreas es un órgano constituido por dos tipos de tejido glandular bien diferenciados. La mayor proporción del parénquima lo constituyen células de tipo exocrino que secretan enzimas digestivas hacia la luz duodenal, completando las células endocrinas la porción minoritaria de la glándula. Estas últimas actúan liberando hormonas a la circulación en respuesta a la concentración plasmática de nutrientes.

Esta descripción general y la que de aquí en más desarrollaremos, se refiere básicamente al plan estructural de los mamíferos (en especial roedores y humanos), pudiéndose hacer extensivo a otros vertebrados superiores (aves y reptiles). Sin embargo, es necesario aclarar que la naturaleza estructural en otros grupos de animales es sustancialmente diferente, habiendo sido ampliamente revisada por Falkmer (1985).

Desarrollo ontogenético.

Existen marcadas diferencias entre el páncreas fetal y el del adulto. En el feto, el componente endocrino puede representar hasta un 10 % de la masa glandular total, mientras que en el adulto esa proporción disminuye hasta un 1%. Esta glándula mixta se origina en la mayoría de las especies de mamíferos, como producto de la

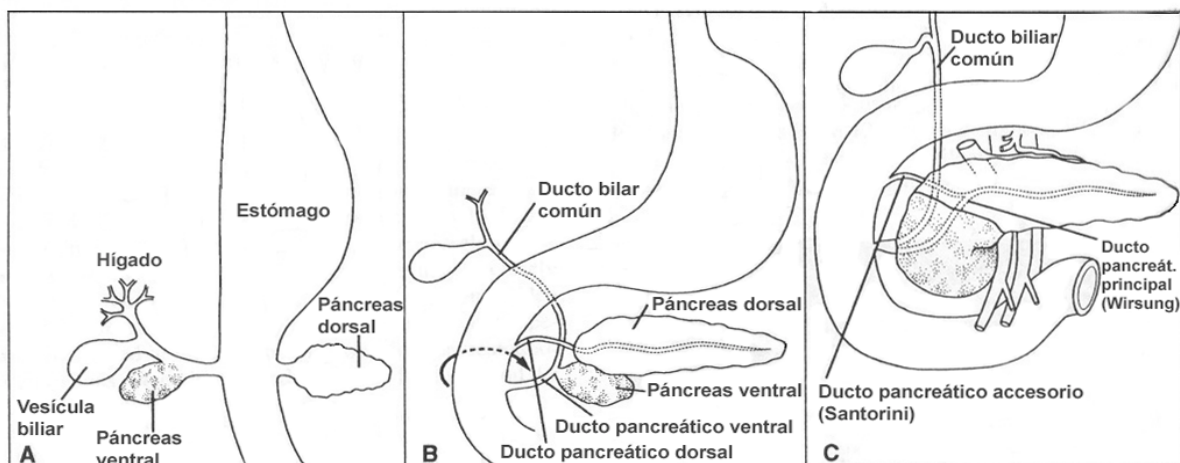


Figura 1.1. Desarrollo del páncreas a partir de los primordios dorsal y ventral

fusión de tres brotes endodérmicos originados, uno a partir de la pared dorsal y los otros dos a partir de la pared ventral del duodeno. Estos últimos, posteriormente se unifican en un único brote ventral (fig. 1.1 A). A medida que el estómago rota junto

con el duodeno, el brote ventral se acerca al brote dorsal hasta hacer contacto y fusionarse con éste (fig. 1.1 B,C). Ambos primordios se desarrollan independientemente formando estructuras muy ramificadas en las que se distinguen células ductales y acinares. Los ductos se conectan progresivamente originando conductos mayores que confluyen en un único conducto que desemboca en la luz intestinal. En el ser humano, los términos cabeza, cuello, cuerpo y cola del páncreas, son usados para designar las regiones del órgano desde la porción proximal a la distal. Si bien en los roedores esta diferenciación topográfica del páncreas está menos definida, también resulta posible identificar las mismas regiones y por lo tanto, los términos se hacen extensivos en su descripción (Slack, 1995; Klimstra, 1997).

El primordio ventral forma la región posterior de la cabeza del órgano, también denominado proceso uncinado, mientras que el dorsal da origen al resto del páncreas. Asimismo, el ducto ventral se fusiona con la porción distal del dorsal para formar el conducto pancreático principal o de Wirsung. La porción proximal del ducto dorsal forma un conducto menor accesorio, denominado conducto de Santorini, que suele desembocar en el duodeno en forma independiente (Slack, 1995).

Aunque el conjunto de las células epiteliales del páncreas embrionario parece constituir una maciza aglomeración de células, a nivel ultraestructural se pudo observar que en realidad estas células conforman una única hoja epitelial complejamente plegada, con una superficie apical y otra basal en continuidad con las del tubo digestivo (Pictet y Rutter, 1972). Alrededor de los días 14 y 15 del período gestacional de los roedores, ya se pueden distinguir acinos y ductos bien diferenciados, originados como consecuencia de las sucesivas divisiones celulares a partir de las dos evaginaciones endodérmicas embrionarias. Estas células epiteliales mantienen a lo largo del desarrollo, un permanente contacto a través de complejos de unión, delimitando una porción apical, orientada hacia el lumen glandular, y una región basal que contacta con una membrana basal. Esta membrana continua, forma una barrera que separa las células epiteliales del mesénquima circundante. Esta organización del tejido epitelial demuestra que las células exocrinas están funcionalmente polarizadas, sintetizando sus productos en la porción basal y liberándolos por su región apical.

El crecimiento de este epitelio glandular, que conforma una monocapa junto con las células ductales, se produce como consecuencia de las sucesivas divisiones celulares que ocurren en forma paralela al plano del epitelio de origen, el que se irá

plegando a medida que aumente su superficie (fig. 1.3; fig. 1.6).

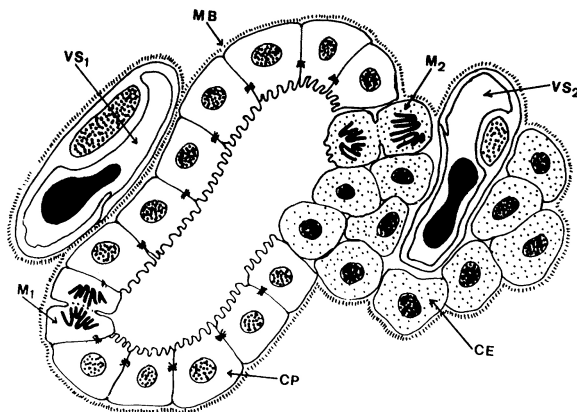


Figura 1.3. El brote pancreático origina células polarizadas (CP), con microvellosidades y complejos de unión, que se reproducen activamente por mitosis (M1) constituyendo el páncreas exocrino. Las células endocrinas (CE) se desarrollan a partir de un origen común con las anteriores, dividiéndose por mitosis (M2), en este caso con su huso acromático perpendicular a la superficie luminal. Los vasos sanguíneos se ubican hacia la base de las células exocrinas (VS1) y en el interior de los islotes en formación (VS2). Ambos esbozos quedan rodeados por una membrana basal (MB).

Origen y diferenciación de las células insulares.

Como ya se ha hecho referencia, la proliferación y posterior fusión de los dos brotes endodérmicos, representan los mecanismos morfogénéticos más evidentes en la organogénesis del páncreas. Este proceso involucra una secuencia de eventos inductivos asociados a la activación de diversos factores de transcripción específicos.

Diversos autores (Bendayan, 1987; Bouwens *y col.*, 1996; Liu y Potter, 1962; Pictet *y col.*, 1972) sugieren que las células insulares se formarían a partir de células ductales y no de células exocrinas preexistentes como había sugerido Laguesse (1895). No obstante, aún se debate si las células endocrinas derivan de la misma población precursora endodérmica de la cual se originan las células exocrinas y ductales o bien, lo hacen de la cresta neural como propuso Pearse (1982) en su concepto del sistema APUD (células capaces de captar y descarboxilar aminas y sus precursores). Este sistema APUD incluiría a las células A y B del páncreas, corticotróficas y melanotróficas de la adenohipófisis, parafoliculares o células C de la tiroides, las células de la médula adrenal y las células argentafines del tracto digestivo. En este sentido, la identificación en células insulares mediante técnicas inmuno-histoquímicas de enzimas relacionadas con el metabolismo adrenérgico (tiroxina hidroxilasa, DOPA descarboxilasa, etc.) sugieren alguna relación entre las células endocrinas pancreáticas y estas células nerviosas (Teitelman *y col.*, 1993).

Sin embargo, otros autores sostienen que tanto las células endocrinas como las exocrinas se diferenciarían a partir de una única población celular pluripotencial derivada del endodermo (Pictet y Rutter, 1972; Andrew, 1976). Este estadio precursor denominado por Pictet y Rutter (1972) como "estado protodiferenciado"

estaría representado en el período postnatal por las células ductales. Si bien la diferenciación y replicación pancreática en el adulto están disminuidas sensiblemente, se ha señalado que el surgimiento de nuevas células se produce principalmente a partir de células indiferenciadas pertenecientes a los ductos.

No obstante, trabajos más recientes (Dor *y col.*, 2004; Georgia *y col.*, 2004), sugieren que las células B preexistentes, más que las células pluripotenciales, serían la principal fuente de nuevas células B durante la vida adulta y luego de la pancreatectomía en el ratón.

Mecanismos y eventos inductivos de la citodiferenciación pancreática

El desarrollo y los mecanismos de citodiferenciación en el páncreas dependen de un delicado balance en la interacción de diversos factores entre el propio endodermo y el mesénquima que lo rodea (Fig. 1.4) (Kim *y col.*, 2002; Maldonado *y col.*, 2000; Miralles *y col.*, 1998). Este concepto fue confirmado por Gittes *y col.* (1996) mediante experimentos realizados con células epiteliales pancreáticas indiferenciadas que se mantuvieron en cultivo, con y sin mesénquima, las cuales en ausencia de éste se diferenciaron en células endocrinas, mientras que en presencia de mesénquima la proporción de células exocrinas se incrementó considerablemente.

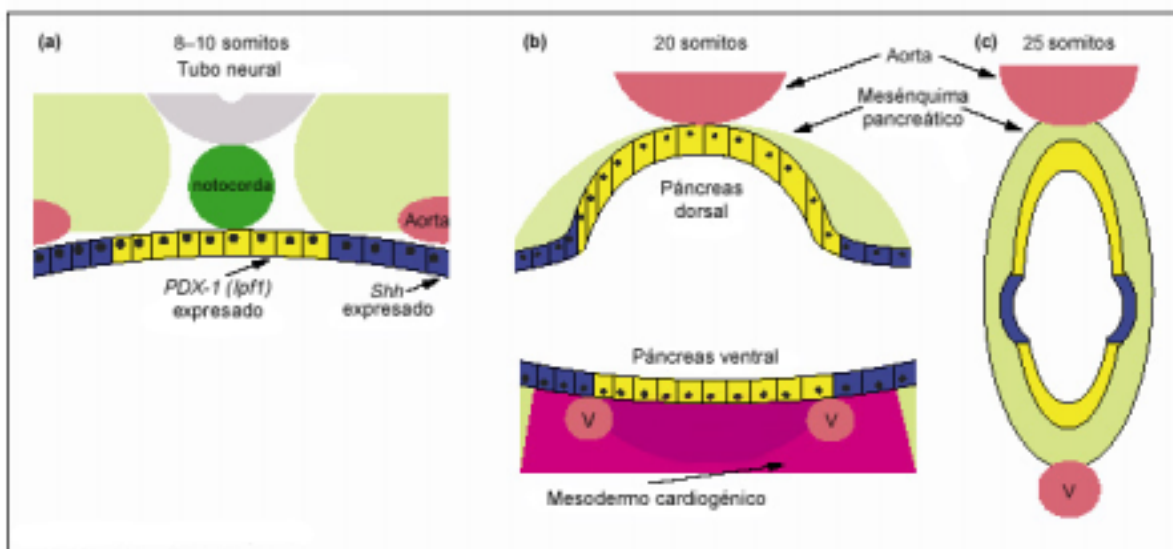


Fig. 1.4. Esquema de los mecanismos y señales inductivas del desarrollo pancreático a partir de las interacciones entre el endodermo del intestino anterior y los derivados mesodérmicos que lo rodean.

Estos estudios reforzaron la idea de que el linaje endocrino representaría el destino por defecto de las células progenitoras y que la expresión de factores

mesenquimáticos estimularía el crecimiento y la diferenciación exocrina, limitando el desarrollo de la línea endocrina.

Aparentemente, la región del intestino a partir de la cual se desarrollarán los primordios pancreáticos, estaría definida en el inicio, por la regulación de la expresión de dos moléculas pertenecientes a la familia de factores denominados Hedgehog (Hebrok *y col.*, 2000; Kim *y col.*, 2002). Dos de estas moléculas: el sonic hedgehog (Shh) y el indian hedgehog (Ihh), se expresan a lo largo de todo el endodermo digestivo. La inhibición del Shh y el Ihh posibilitaría la expresión de diversos factores de transcripción pancreáticos, incluyendo el gen homeótico PDX-1 (también denominado *Ipf1*), principal responsable del desarrollo de este órgano y fundamentalmente de la línea celular endocrina (Edlund, 1999, 2001; Hebrok *y col.*, 1998, 2000; Hill *y col.*, 2000; Hui *y col.*, 2002; Kim *y col.*, 1997; Murtaugh, 2007)

Otros autores demostraron además la participación durante el desarrollo pancreático, de un mecanismo de comunicación lateral denominado señalización Notch (Apelqvist *y col.*, 1999; Murtaugh *y col.*, 2003). Este mecanismo controlaría la dicotomía exocrino/endocrino en el desarrollo pancreático a través de la modulación de la expresión de genes específicos en la citodiferenciación del páncreas.

En cuanto a las diferentes poblaciones celulares endocrinas, se ha especulado durante mucho tiempo sobre si se originaban a partir de diferentes células precursoras o, alternativamente, de una única población celular. Esta última teoría sería la más consistente, ya que además, no existen evidencias de la existencia de más de un tipo de célula precursora de células exocrinas y endocrinas.

Existen distintos modelos propuestos sobre los mecanismos de neogénesis insular del páncreas. Estos tratan de relacionar la expresión diferencial de los distintos genes y factores de transcripción de las células insulares durante el desarrollo y en menor proporción en el período postnatal.

Las células ductales serían homólogas a las células protodiferenciadas del intestino primitivo, preservando la capacidad de diferenciarse como células exocrinas y endocrinas. Uno de los mayores inconvenientes, para el análisis de esta hipótesis, reside en los pocos marcadores existentes para la identificación de dichas células precursoras. Durante mucho tiempo, se estudió en el páncreas la expresión de las proteínas del citoesqueleto características de las células epiteliales: las citoqueratinas (CK). Mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha descrito la presencia de varios tipos de CK en páncreas de diferentes especies de mamíferos (Bouwens, 2000).

Diversos estudios han sido efectuados para caracterizar las principales líneas celulares derivadas de la población precursora, para dar origen a las células A, B, D y PP (Sosa Pineda *y col.*, 1997; St-Onge *y col.*, 1997). Así, mediante técnicas inmunocitoquímicas se identificaron distintos marcadores neuroendocrinos y factores de transcripción expresados en los diferentes estadios del desarrollo embrionario pancreático. (Edlund, 1999, 2001; Gu *y col.*, 2002; Kim *y col.*, 2002; Nielsen *y col.*, 1998, 2001; St-Onge *y col.*, 1999; Yamaoka *y col.*, 1999)

Formación de los islotes de Langerhans.

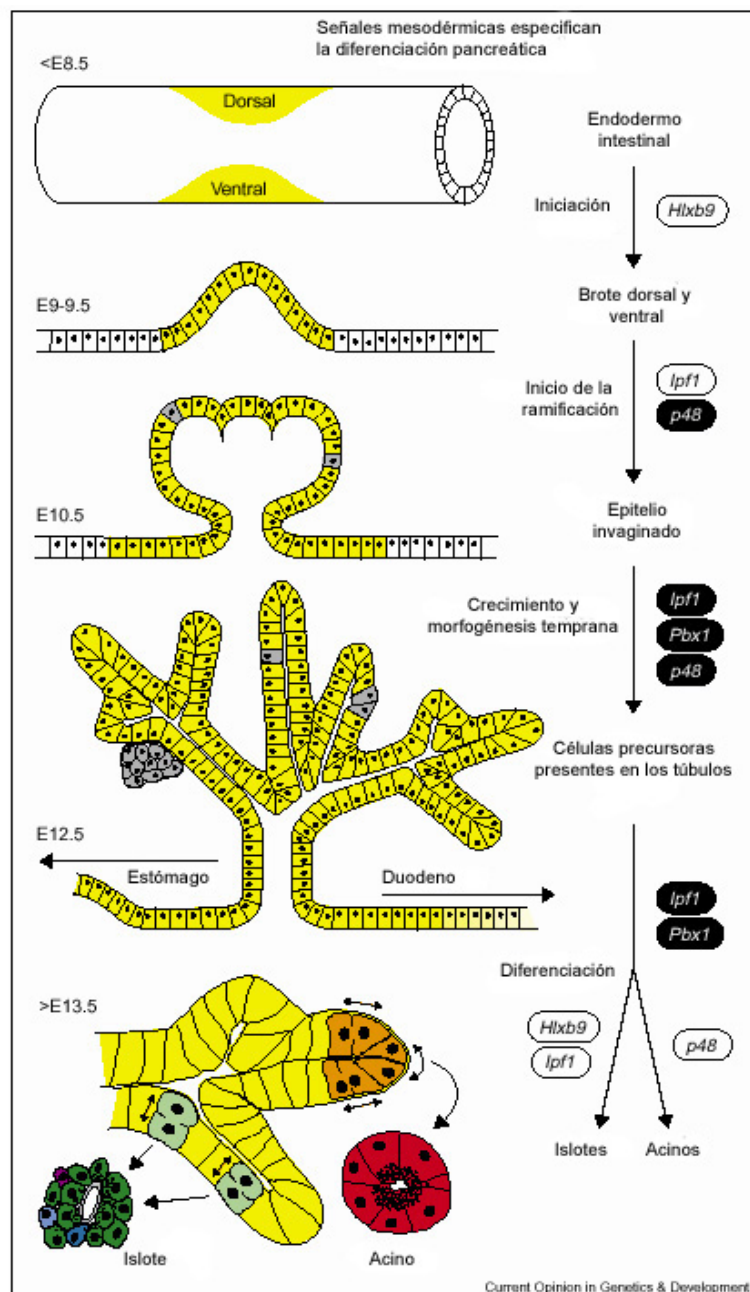
Como se ha hecho referencia previamente, las células endocrinas se originan a partir de las células epiteliales protodiferenciadas. Este proceso de diferenciación se

Figura 1.5. Eventos de la organogénesis pancreática.

Desarrollo de los rudimentos dorsal y ventral. En amarillo se indica la expresión de *Ip1* (PDX-1) y en gris la temprana diferenciación de las células endocrinas. A la derecha se describen los principales factores de transcripción involucrados en cada una de las etapas detalladas. En negro se resaltan aquéllos con nuevos roles asignados.

Finalmente, las doble flechas indican la orientación del eje de división de las células acinares y endocrinas.

Modificado de Curr O Genet Dev 12: 540-547. 2002.



inicia en dichas células epiteliales que conforman el primordio pancreático embrionario. Las células endocrinas pueden ser identificadas a través de la presencia de gránulos de glucagón. A medida que las células se diferencian, la mayoría "escapa" de la matriz exocrina de la que forman parte (fig. 1.3, 1.5). Este "escape" se debería a un cambio en el eje de división celular, que se hace perpendicular a la luz, quedando por lo tanto, una de las células hijas unida al epitelio exocrino mediante complejos de unión, mientras que la otra se libera (fig. 1.3; 1.5). Estas nuevas células libres, se agrupan formando acúmulos o "*clusters*", que inicialmente carecen de vascularización y se vinculan estrechamente a los ductos (fig. 1.5). Estos nidos celulares quedan finalmente aislados de la matriz exocrina, donde adquieren una rica vascularización.

Histoarquitectura del islote

Estos grupos de células aisladas fueron descritos por primera vez por Paul Langerhans en 1869, quien los caracterizó con el nombre de "islotos", por lo que posteriormente se los denominó *islotos de Langerhans*.

Los islotos no están uniformemente distribuidos por todo el órgano. Existiría una mayor proporción en la región caudal (adyacente al bazo), aunque según algunos autores esta asimetría en su distribución no sería tan evidente. Si tenemos en cuenta las diferentes especies, edades y la posible manifestación de patologías asociadas al páncreas, la forma y el tamaño de los islotos varían considerablemente, aunque en general presentan un aspecto esférico y un diámetro aproximado de 140 μm . (Gagliardino y col., 1994)

Existen marcadas diferencias entre el páncreas fetal y el del adulto. En el feto, la porción endocrina puede representar hasta un 10% de la masa total, mientras que en el adulto esa proporción se reduce a un 1% aproximadamente.

Tipos celulares endocrinos.

Tanto en el hombre como en la rata adulta, han sido identificados cuatro tipos principales de células endocrinas: A (α), B (β), D (δ) y PP, responsables de la secreción de glucagón, insulina, somatostatina y polipéptido pancreático respectivamente.

La proporción y distribución de cada tipo celular varía de acuerdo a la especie y a la etapa del desarrollo consideradas. Como ya ha sido aclarado previamente, tomaremos a la rata adulta como referencia para la descripción de los porcentajes y la localización de los diferentes tipos celulares.

Células A: Secretan glucagón, un péptido de 29 aminoácidos, que posee acción

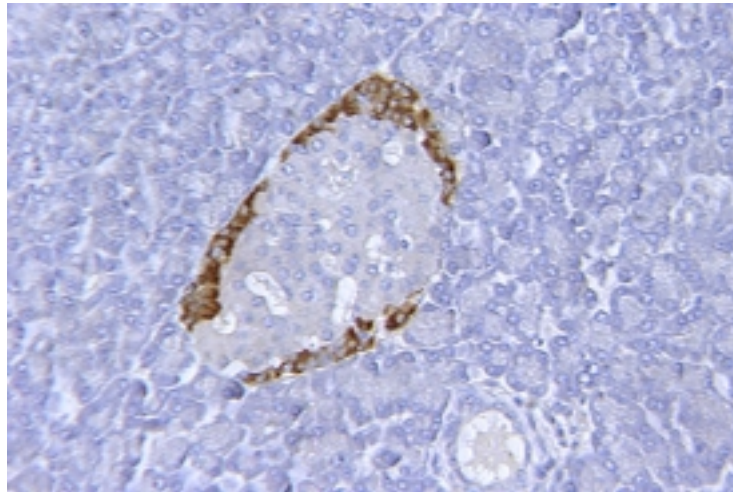


Figura. 1.7. Inmunomarcación para células A, secretoras de glucagon. x 250

hiperglucemiante, el cual deriva de un precursor de 180 aminoácidos (proglucagón). En las células L del intestino este mismo precursor se cliva de manera diferente al pancreático, formando otros péptidos como el glucagón similar (GLP 1,2), la glicentina y la oxintomodulina. Su acción es opuesta al glucagón pancreático, ya que su liberación es estimulada por el aumento postprandial de la glucemia.

Las células A representan del 15 al 20% de la población insular. La inmunohistoquímica evidencia su distribución en la periferia del islote (fig. 1.7), como así también alrededor de los capilares que penetran en el mismo.

La microscopía electrónica revela gránulos de secreción redondeados, densos, con un estrecho halo claro periférico por debajo de la membrana envolvente granular.

Células B: Secretan insulina, una hormona peptídica de 51 aminoácidos, de acción hipoglucemiante, producto del clivaje de una molécula precursora de mayor tamaño la preproinsulina. Esta luego se escinde formando la proinsulina que dará

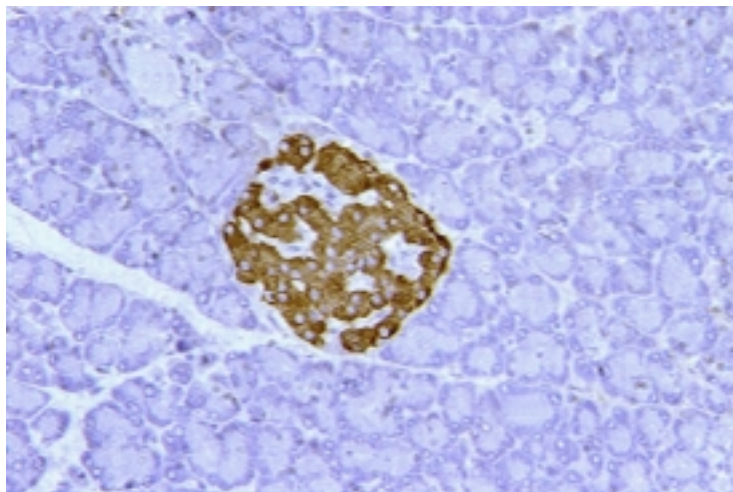


Figura. 1.8. Inmunomarcación para células B, secretoras de insulina. x 250

origen finalmente, en los gránulos maduros, a la insulina y al péptido conector o péptido C. Este último, conecta la cadena A con la cadena B de la molécula de insulina. El tipo celular B es el más numeroso (70 al 80%) del tejido endocrino y se distribuye preferentemente en la región central del islote (fig. 1.8).

Mediante microscopía electrónica se observan gránulos densos constituidos por cristales de insulina asociados a zinc (hexámeros) con un amplio halo claro en la periferia. Mediante técnicas de inmunoelectrónica se identificó la presencia de insulina en la porción electrodensa del gránulo y del péptido conector (C) en la región del halo.

Células D: Secretan somatostatina, un péptido de 14 aminoácidos aislado inicialmente en el hipotálamo, y denominado factor inhibidor de la liberación de somatotrofina (SRIF). Posteriormente se la identificó mediante inmunohistoquímica en las células D del páncreas y en otras poblaciones celulares del organismo. Se

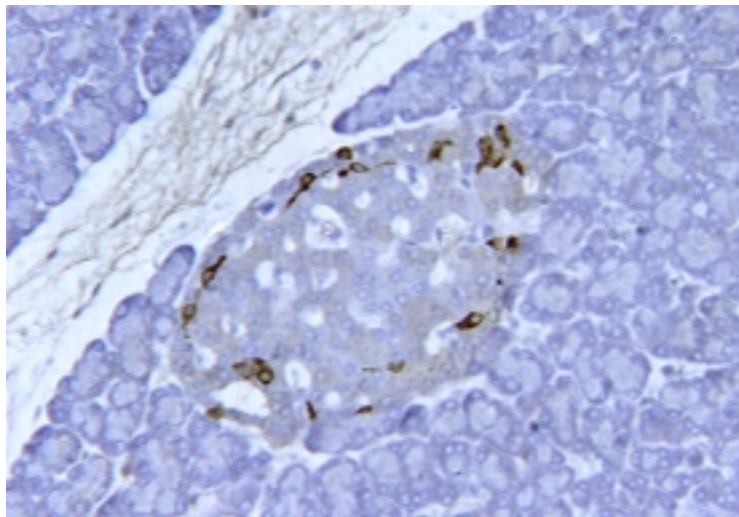


Figura. 1.9. Inmunomarcación para células D, secretoras de somatostatina. x250

distribuyen en la región periférica del islote (fig. 1.9) y también junto a los capilares, por lo que evidencian una estrecha relación con las células A. Su acción inhibitoria generalizada no es una excepción a nivel del páncreas. Este péptido actúa como un potente inhibidor de la secreción de insulina y glucagón.

Al microscopio electrónico muestran gránulos de densidad moderada, con la membrana adosada al contenido granular.

Células PP: Secretan polipéptido pancreático, péptido compuesto por 36 aminoácidos. Este péptido, ha sido detectado también en células epiteliales del tracto digestivo.

Su distribución en el páncreas es bastante asimétrica, siendo el tipo celular más abundante en los islotes ubicados en la parte posterior e inferior de la cabeza del páncreas, que derivan del primordio ventral. Las células PP se disponen generalmente en la periferia (fig. 1.10), asociadas a los demás tipos celulares y a los capilares sinusoides.

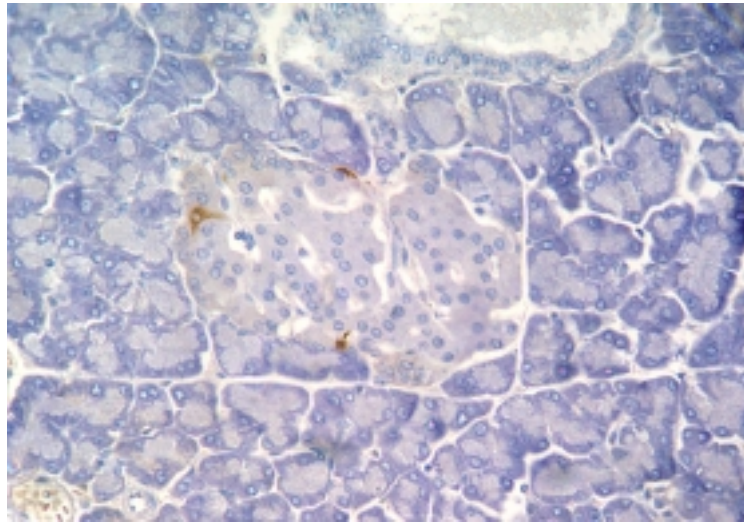


Figura. 1.10. Inmunomarcación para células PP, secretoras de polipéptido pancreático. x 250

Mucho se ha discutido sobre su función, aunque se le suele atribuir un efecto inhibitorio sobre la secreción de insulina, además de una acción inhibitoria sobre la porción exocrina con relación a la ingesta de alimento.

Irrigación de los islotes

La mayor parte del páncreas recibe sangre arterial proveniente de la arteria celíaca, mediante las ramas pancreático-duodenal inferior y esplénica. Cada islote recibe una irrigación directa por medio de una rica red capilar. Luego estos capilares se fusionan con vénulas que drenan directamente en la vena porta, pudiendo irrigar previamente la porción exocrina. Así, el tejido exocrino periinsular está expuesto a altas concentraciones de hormonas insulares secretadas en los capilares del islote. Estos capilares presentan fenestraciones cerradas por diafragmas (Bearer *y col.* 1985), las que permiten únicamente el paso de pequeñas moléculas evitando el pasaje de grandes proteínas séricas. Además, las células insulares presentan microvellosidades en su superficie adyacente a los capilares, dónde se produciría la exocitosis de las vesículas de secreción.

Mucho se ha discutido respecto a los modelos de flujo capilar dentro del islote. Sobre la base de estudios histológicos, se han descripto dos modelos diferentes que

intentan explicar la circulación insular. Un primer modelo (Fujita, 1973, Fujita *y col.*, 1973) plantea que las arteriolas aferentes se ramifican primero en la porción no B, estén estas ubicadas en el centro del islote o en la periferia. El otro modelo, propuesto por Orci y Bonner-Weir (1982), sostiene por el contrario, que las arteriolas que llegan al islote se ramifican en primer lugar en la zona B, para luego irrigar la porción no B. La implicancia de considerar uno u otro modelo se sustenta en la relación funcional entre las distintas poblaciones insulares y la influencia que cada una de estas podría tener sobre las otras. Según el primer criterio las células B estarían expuestas a los productos de secreción de las células no B, las que de hecho alteran las funciones de esta población. Por otro lado, según el criterio de Orci y Bonner-Weir esta influencia sólo sería posible una vez que la sangre abandonase el páncreas, pase por el hígado, la circulación general y retorne a los islotes pancreáticos. Si bien estos modelos se basaron en estudios morfológicos, posteriormente Stagner y Samols (1992) confirmaron mediante estudios efectuados en páncreas humano, que la circulación sanguínea primero irriga la región B y luego la no B, dentro de la cual habría una secuencia desde las células A hacia las D.

Inervación de los islotes

El islote recibe axones de neuronas ganglionares colinérgicas y peptidérgicas ubicadas en los ganglios parasimpáticos del páncreas. Además, recibe inervación por parte de neuronas posganglionares adrenérgicas, desde el ganglio celíaco y otros ganglios paravertebrales.

Las neuronas peptidérgicas contienen péptido intestinal vasoactivo, galanina, colecistoquinina-símil y GABA, los que en mayor o menor medida modifican la secreción de insulina. Sus fibras terminan en el espacio pericapilar o cerca de la superficie de las células endocrinas, pero no presentan sinapsis directas con estas últimas. Las fibras colinérgicas se relacionan en forma preferencial con las células A. No obstante, ninguna de las diferentes clases de neuronas se relacionarían con un único tipo celular, siendo en su totalidad fibras amielínicas acompañadas por células de Schwann.

Síntesis y secreción de la insulina.

Como se ha expuesto previamente, la insulina se sintetiza a partir de una molécula precursora, denominada *preproinsulina*, que por clivaje de una secuencia peptídica señal, da origen a la *proinsulina* (fig. 1.12). Luego se separa el péptido conector (C) de la insulina por la acción de proteasas específicas, almacenándose en el interior de los gránulos de secreción, donde permanecerá hasta ser liberada, en respuesta a algún estímulo. Esta forma de liberación condicionada común a otros mensajeros peptídicos, se denomina secreción “regulada”, mientras que en el caso de las proteínas que se secretan a medida que son sintetizadas sin la posibilidad de almacenarse previamente, se denomina secreción “constitutiva”.

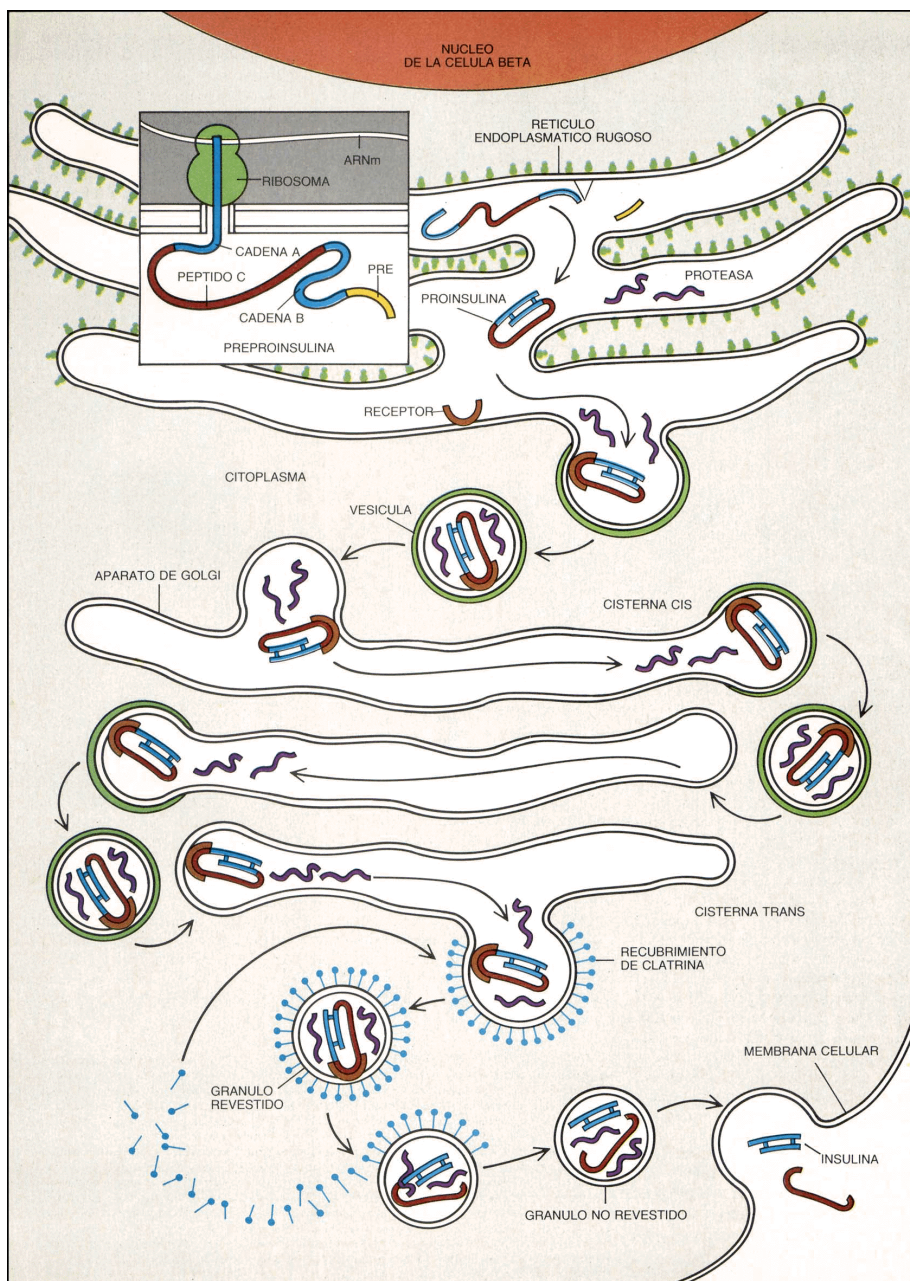


Figura 1.12. SÍNTESIS DE INSULINA.

Explicación en el texto.

Tomado de: Orci y col., La fábrica de insulina. Investigación y ciencia 1988, 146: 52-63.

Junto con el péptido C y una pequeña cantidad de proinsulina sin clivarse, la insulina se almacena en los gránulos desnudos, dispuesta ya para su secreción en respuesta a un estímulo apropiado, como por ejemplo el aumento de la glucosa plasmática. Para ello, los gránulos deben desplazarse a través del citoplasma hasta la membrana plasmática para poder ser liberada hacia el espacio extracelular mediante exocitosis (Orci, 1982, 1988), desde donde atravesará el endotelio para entrar a la circulación sanguínea (fig. 1.12).

Aparentemente, la actina actuaría asociada a la membrana plasmática, a modo de diafragma, regulando el pasaje de los gránulos de insulina desde el citoplasma al espacio intersticial. Experimentos con citochalasin B confirmaron esta suposición, ya que su acción produce la destrucción de estos microfilamentos de actina, ocasionando una liberación masiva de insulina. (Malaisse *y col.*, 1971; Somers *y col.*, 1979).

La célula beta del páncreas representa uno de los modelos mejor caracterizados sobre secreción endocrina (Arvan *y col.*, 1998; Gerber *y col.*, 2002; Kuliawat *y col.*, 1994).

La secreción de insulina resulta de la acción estimuladora de los nutrientes (glucosa y aminoácidos), modulada por el efecto de hormonas y neurotransmisores (fig. 1.13; 1.14) que actúan a través de receptores específicos de membrana acoplados a proteínas transductoras de la señal (proteínas G) (Lang, 1999).

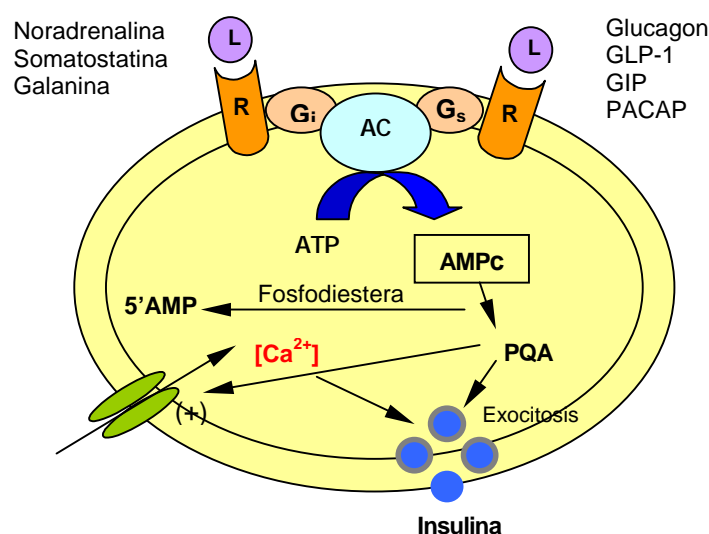


Fig. 1.13. Principales moduladores de la secuencia de eventos relacionados a la vía de la AC-AMP_c.
L: ligando; AC: adenilato ciclasa; AMP_c: adenosinmonofosfato cíclico; G_s: proteína G estimuladora; G_i: proteína G inhibidora; PQA: proteinquinasa A; R: receptor

La célula B posee la capacidad de ajustar la secreción de insulina en relación a la concentración de dichos nutrientes y otros agentes agonistas. Este delicado control está mediado por diversos procesos celulares, los que en su mayoría se relacionan de forma directa o indirecta con cambios en el potencial de membrana de la célula beta, asociados a las modificaciones del flujo de iones a través de dicha membrana (Ashcroft y Ashcroft, 1990). Estos eventos iónicos, resultan clave en el acoplamiento

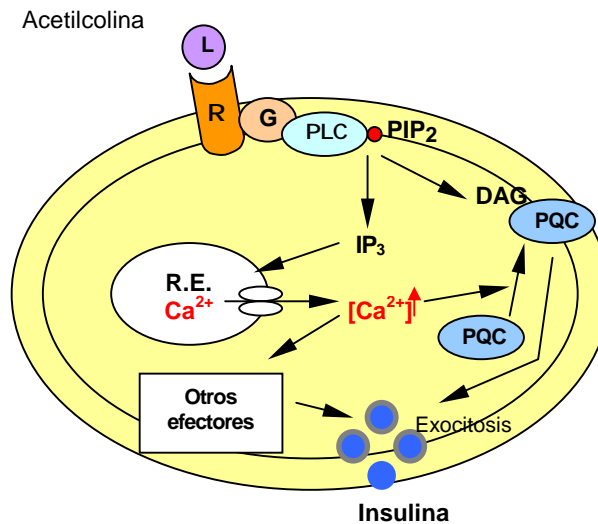


Fig. 1.14. Principales eventos de señalización intracelulares en la vía de los fosfoinosítidos.

L: ligando; DAG: diacilglicerol; G: proteína G; IP₃: inositoltrifosfato; PIP₂: fosfatidilinositol bífosfato; PLC: fosfolipasa C; PQC: proteinquinasa C; R: receptor

del estímulo a la respuesta secretora (Rajan *y col.*, 1990). Así, el efecto de la glucosa se traduce a través de receptores de membrana que modifican la concentración intracelular de segundos mensajeros tales como el AMPc, los fosfoinosítidos y el calcio (Ca^{2+}) (Wang, 1993). El incremento de la concentración citosólica de estos segundos mensajeros, promueve la activación de diferentes proteína quinasas (PQ) responsables de la fosforilación de enzimas y otros componentes celulares, principalmente proteínas del citoesqueleto. Aparentemente, la acción de las PQ sobre dichas proteínas citoesqueletarias induciría la movilización de las vesículas de secreción hacia la membrana plasmática, posibilitando la fusión de ambas membranas (vesicular y plasmática) y la liberación del contenido granular al espacio intercelular.

El mecanismo mejor caracterizado en el acoplamiento estímulo-secreción, es el relacionado con los cambios en el cociente citosólico ATP/ADP (fig. 1.13). Se ha demostrado (Ashcroft y Ashcroft, 1990; Ashcroft y Rorsman, 1991) que el aumento de dicho cociente, producto de oxidación metabólica, promueve un descenso en la

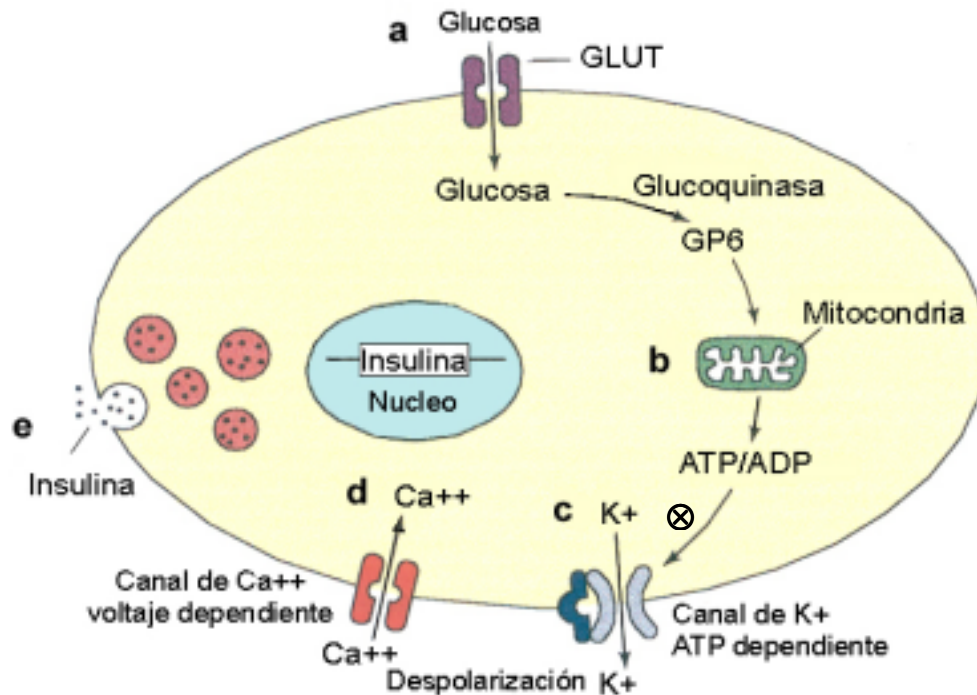


Figura 1.15. Principales eventos en la secreción de insulina. a. El primer paso consiste en la entrada de la glucosa a la célula a través de su transportador específico (GLUT). Una vez dentro la glucosa es convertida en glucosa-6-fosfato (GP6) mediante la glucoquinasa, enzima limitante en el acoplamiento de la glucosa a la secreción de insulina. b. El metabolismo completo de la glucosa genera ATP. c. El aumento en el cociente ATP/ADP disminuye la actividad de los canales de K⁺ ATP dependientes, modificando la permeabilidad de este catión ocasionando la despolarización de la membrana plasmática. d. Esta alteración de la membrana promueve la apertura de los canales de Ca²⁺. e. El aumento del Ca²⁺ intracelular induce la secreción de las vesículas cargadas de insulina. *Modificado de Mol Med Today, Abril 1999 (vol. 5)*

permeabilidad de la membrana al K⁺ mediante el cierre de los canales K_{ATP} dependientes, provocando como consecuencia su despolarización. Esta alteración en la polaridad de la membrana induce la apertura de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Wang *y col.*, 1993; Lang, 1999), incrementando de esta manera la entrada de Ca²⁺ a la célula y en consecuencia, el aumento de su concentración intracelular, fundamental en la estimulación de la secreción de insulina (Hisatomi *y col.*, 1996). También existen canales de K_{Ca²⁺} dependientes, activados por el aumento del Ca²⁺ citosólico y canales de K⁺ inhibidores, denominados así ya que se activan por la acción de inhibidores de la secreción de insulina.

Sin embargo, la glucosa no sólo promueve la captación de Ca²⁺ extracelular mediante los mecanismos descritos, sino que también favorece la entrada de Ca²⁺ de forma directa a través de dichos canales (Smith *y col.*, 1989). Cabe aclarar que no todo el Ca²⁺ citosólico proviene del espacio extracelular. Buena parte del aumento de su concentración citoplasmática, es aportada por depósitos intracelulares a nivel del retículo endoplasmático.

4. DIABETES MELLITUS

La Diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica, representada por un grupo de alteraciones aparentemente heterogéneas, cuya característica común es la hiperglucemia.

Existen numerosas clasificaciones de la DM basadas en diferentes criterios. A partir de 1995, luego de los aportes de la comunidad diabetológica internacional y de un análisis pormenorizado de la literatura científica de los últimos años, se definieron los criterios básicos respecto a su definición, características, clasificación, criterios y pruebas de diagnóstico.

Definición y características de la DM

La DM es una enfermedad metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia, producto de un defecto en la secreción de insulina, en la actividad de dicha hormona, o en ambas.

La inadecuada función de la célula B representa un componente esencial en casi todas las formas de DM (Weir *y col.*, 2001). Así, existen diversos procesos patogénicos involucrados en el desarrollo de la DM, que van desde la destrucción autoinmune de las células B, hasta anormalidades diversas que producen generalmente una resistencia a la acción de la hormona. La acción insulínica deficiente resulta de la secreción inadecuada de la misma (descenso de la masa y/o función celular) y/o de la menor respuesta de los tejidos a nivel de uno o más sitios de su complejo mecanismo de acción. Tanto el deterioro de la secreción de la hormona como su acción deficiente, generalmente coexisten en el desarrollo de la DM, por lo que resulta difícil definir cuál de estas anormalidades es la causa primaria de la hiperglucemia.

No obstante, el estado hiperglucémico sería el responsable de una serie de complicaciones crónicas, como la retinopatía, la nefropatía y las neuropatías periféricas (pie diabético, úlceras) y autonómica (causante de disfunciones gastrointestinales, urogenitales, cardiovasculares y sexuales). El mecanismo por el cual los niveles elevados de glucosa plasmática ocasionan dichas alteraciones, estaría vinculado al proceso de glicosilación no enzimática de las proteínas tisulares (fundamentalmente las de vida media larga) y formación de AGEs, descrito en párrafos anteriores. En concreto, niveles elevados de glucosa (hiperglucemia) en forma sostenida ocasionarían la acumulación de AGE y una consiguiente alteración

de los tejidos (Cerami *y col.*, 1987).

Además, la DM aumenta la incidencia de otras enfermedades como la aterosclerosis y las enfermedades vasculares, la hipertensión arterial, las alteraciones en el metabolismo lipoproteico, etc.

Clasificación de las distintas formas de DM

Como ya hemos mencionado, la clasificación de la DM ha ido actualizándose a través de los años gracias al continuo aporte de la investigación científica, con el objetivo de proporcionar un esquema claro y apropiado para identificar y diferenciar sus diferentes formas de manifestación y estadios.

Así, la mayoría de los casos de DM se agrupan en dos grandes categorías etiopatogénicas. La primera (DM tipo 1) se caracteriza por una deficiencia absoluta de la secreción de insulina, producto de una respuesta autoinmune del organismo contra las células insulares. La otra gran categoría (DM tipo 2) abarca numerosas y diferentes formas de DM, cuyas causas se resumen en la combinación de dos características principales: un estado de resistencia a la acción de la insulina por las células blanco, y una insuficiente respuesta compensadora de su secreción.

Si bien estos dos tipos de DM poseen características etiológicas y mecanismos patogénicos diferentes, ambas desarrollan el mismo tipo de complicaciones crónicas en vasos sanguíneos, riñones, retina, nervios periféricos, etc., que representan la principal causa de mortalidad asociada a esta enfermedad. Cabe recordar que la DM es la séptima causa de muerte en los EE.UU y lo que es aun más grave: la incidencia de la DM tipo 2 en personas de menos de 40 años ha aumentado en un 70 % en los últimos 10 años en dicho país. En la Argentina más de nueve mil personas mueren por año a causa de la DM, lo que representa el 3% del total de defunciones que se registran en el país, según arrojaron los últimos estudios (2003) sobre Estadísticas Vitales que difundió la Dirección de Estadísticas e Información de Salud de la Nación.

Diabetes Tipo 1

Como ya hemos mencionado, este tipo de DM, también denominada insulín dependiente (DMID) o de comienzo juvenil, se caracteriza por una deficiencia absoluta de la secreción de insulina, como consecuencia de la destrucción autoinmune de las células B del páncreas (Atkinson *y col.*, 1994). Se desarrolla comúnmente en individuos jóvenes (infancia – adolescencia), aunque también es posible su manifestación en edades avanzadas. Una característica diferencial en el

diagnóstico de la DM tipo 1 es la detección de diversos autoanticuerpos (aa), como por ejemplo los aa contra proteínas propias de las células de los islotes (ICA), la insulina (IAA) y la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), (Atkinson *y col.*, 1993; Kaufman *y col.*, 1992). Como ocurre en otras enfermedades autoinmunes, la DM tipo 1 presenta una estrecha vinculación con los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), principalmente del complejo CMH II. Aparentemente estos genes polimórficos (DP, DR, DQ) del CMHII, estarían involucrados tanto en la susceptibilidad como en la protección de la DM 1. De esta manera, se cree que sería la inmunidad celular más que la humoral, la responsable del desarrollo de este tipo de DM. Se ha observado que los individuos con DM tipo 1 poseen una mayor predisposición a padecer otras enfermedades autoinmunes, como la tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, anemia perniciosa, vitiligo y enfermedad de Addison.

Existen algunas formas de DM tipo 1 que no tienen una etiología conocida, caracterizadas por una tendencia a la cetoacidosis e insulino-deficiencia variable, aunque sin evidencias de autoinmunidad. Esta forma de DM posee un importante factor hereditario, carece de aa u otra evidencia inmunológica de autoinmunidad y no estaría asociada al CMH II. A este tipo de diabetes se la denomina también Idiopática, y representa una minoría entre los pacientes con DM tipo 1.

Diabetes Tipo 2

Esta otra forma de DM, frecuentemente de inicio en edad adulta, está caracterizada por un cuadro de insulinoresistencia y una deficiencia insulínica relativa más que absoluta. Numerosos son los factores que intervienen en las distintas formas de esta DM y aunque su etiología no se conoce con detalle, se sabe que no existe destrucción autoinmune de la población B y que presenta una importante predisposición genética (Newman *y col.*, 1987).

Mucho se ha estudiado respecto a la estrecha relación entre la DM tipo 2 y el fenotipo obeso. Así, la obesidad desencadenaría un cierto grado de insulinoresistencia, que no siempre conlleva a un estado diabético. En este sentido, los mecanismos específicos por los cuales la obesidad contribuiría al desarrollo de la DM aun no están del todo claros. No obstante, numerosas investigaciones sugieren que el exceso de lípidos en las células no-adipocíticas, incluyendo las células B, alteraría su función ocasionando serios trastornos en su metabolismo normal, por ejemplo insulinoresistencia, y su posible muerte por apoptosis (Pick *y col.*, 1998;

Shimabukuro *y col.*, 1997, 1998, 1998; Unger, 1997; Unger *y col.*, 1999; Unger *y col.*, 2002). El hecho de que la hiperglucemia se desarrolle gradualmente, ocasiona que aun sin una manifestación evidente de los síntomas, exista un alto riesgo de que se desarrollen lesiones micro y macrovasculares (Fujimoto *y col.*, 1987). Por otra parte, los niveles de insulina son variables, dependiendo del grado de hiperglucemia y del nivel de insulinoresistencia en los tejidos. El estado diabético se establece cuando las células B, frente a un estado de insulinoresistencia, no logran compensar el nivel de insulina necesario para mantener la normoglucemia. Así, la resistencia a la insulina asociada frecuentemente a la obesidad, ejercería un estrés excesivo sobre las células B, haciendo que dicha población sea incapaz de responder ante la necesidad de mantener constante un estado de hipersecreción (Cavaghan, 2000; Kahn, 1998; Weir *y col.*, 2001). La insulinoresistencia puede disminuir con la reducción de peso y/o el tratamiento farmacológico de la hiperglucemia, aunque es difícil que retorne a sus valores normales (Wing *y col.*, 1994). Más recientemente se ha avanzado sobre nuevas terapias contra la resistencia a la insulina a través de drogas denominadas tiazolidinedionas (TZD) que actuarían como ligandos de receptores nucleares involucrados en la regulación del metabolismo lipídico y glucídico, denominados *peroxisome proliferator-activated receptors γ* (PPAR γ) (Kliwer *y col.*, 1998, 1999; Olefsky, 2000). Estos receptores pertenecen a una familia de receptores nucleares de caracterización reciente, que tendrían una estrecha relación con numerosas patologías, por lo cual son motivo de intensas investigaciones en la actualidad. (Ferré, 2004; Vamecq, *y col.*, 2000).

El origen de la DM tipo 2 aun es tema de debate, aunque según la mayoría de las evidencias, resultaría de la interacción entre complejos factores genéticos y condicionantes externos. El componente hereditario sigue siendo un tema a esclarecer. Si bien no se han caracterizado los genes involucrados en el desarrollo de esta patología, la mayoría de los investigadores coinciden en considerar que la DM tipo 2 posee un origen multigénico (De Fronzo, 1997; Kahn, 1994).

Finalmente, es importante subrayar que el riesgo de desarrollar este tipo de DM se incrementa con la edad, la falta de actividad física, el estrés y como ya hemos mencionado, la obesidad, quedando de manifiesto la incidencia directa del paso de los años asociado a una mala calidad de vida como principal factor de riesgo de la DM tipo 2, más allá del componente hereditario.

Posibles mecanismos involucrados en la alteración de la secreción y/o acción de la insulina en la DM tipo 2.

Como ya hemos mencionado, en este tipo de DM la hiperglucemia resulta de la combinación de defectos en la secreción de insulina y en la acción de la misma sobre los tejidos. Por ello, los principales factores en el desarrollo de esta enfermedad son la insulinoresistencia y la defectuosa secreción insulínica como consecuencia del deterioro de la función celular B.

Alteración de la secreción de insulina

Mientras la insulinoresistencia representa un evento temprano en el desarrollo de la DM, la hiperglucemia no se manifiesta hasta que las células B comienzan a fallar en su intento de sostener los elevados niveles de insulina necesarios para compensar el estado de resistencia a dicha hormona. En el período inicial de la DM los niveles de insulina suelen ser normales, aunque ya se detectan algunas alteraciones. La más evidente está asociada a la pérdida de la pulsatilidad de su secreción (Cavaghan *y col.*, 2000; Polonsky *y col.*, 1988). Con el tiempo, los niveles glucémicos se elevan hasta constituir un estado hiperglucémico crónico, el que al menos en parte, estaría relacionado con la disminución de los GLUT-2, transportadores responsables de facilitar la entrada de glucosa en la células B (Leahy, 1996) y la actividad de la glucoquinasa, enzima clave en la glucólisis, responsable de la fosforilación de la glucosa, una vez que ésta ingresa en la célula beta (Cockburn *y col.*, 1997; Matschinsky, 1993).

Por otra parte, la alta incidencia de la obesidad en la DM, complica aun más el estudio y la identificación de los mecanismos responsables de la disfunción de la población B.

Sabemos que la obesidad, incluso en ausencia de DM, se caracteriza por un estado de insulinoresistencia e hiperinsulinemia compensadora. En el caso de individuos que además de obesidad desarrollan DM, éstos presentan un perfil metabólico similar aunque los niveles relativos de insulina son inferiores, indicando un déficit en la producción de la hormona (Garvey *y col.*, 1988). No obstante, cabe aclarar que la distribución y el tipo de tejido adiposo tendrían una estrecha relación con la resistencia a la insulina. Según investigaciones realizadas, la adiposidad intra-abdominal, más que la obesidad general, sería especialmente responsable del descenso de la sensibilidad a la insulina (Barzilai *y col.*, 1997, 1999; Boyko *y col.*, 2000).

Actualmente, siguen siendo tema de debate las causas del déficit de insulina. Algunos autores refuerzan la idea de que dichas causas tendrían que ver más con variaciones en la masa celular B que con su función, mientras que otros sostienen lo contrario, aunque la mayoría admite la coexistencia de ambos factores (Clark *y col.*, 2001; Weir *y col.*, 2001)

Resistencia a la insulina

Esta menor sensibilidad (resistencia) a la insulina por parte de los tejidos blanco, representa un aspecto característico de la DM tipo 2 y es casi una constante en aquellos casos en que esta forma de la enfermedad se combina con la obesidad (Kahn *y col.*, 2000; Unger *y col.*, 2002).

La insulinoresistencia es una condición necesaria para el desarrollo de la patología diabética tipo 2, aunque queda claro que existirán individuos que manifiesten resistencia a la insulina y no desarrollen DM. Algunos de los estados insulinoresistentes sin desarrollo de diabetes incluyen a la obesidad, al embarazo, al síndrome poliquístico ovárico y en menor medida, al envejecimiento.

Además existen numerosas anomalías asociadas con la resistencia a la insulina, las que fueron reunidas por Reaven (1988) bajo el término "Síndrome X". Este síndrome incluye individuos insulinoresistentes e hiperinsulinémicos que padecen dislipidemias (usualmente triglicéridos elevados y bajos niveles de la lipoproteína de alta densidad: HDL). Frecuentemente, estos individuos presentan hipertensión y ácido úrico elevado, entre otras características. Así la evidencia epidemiológica sugiere que pacientes con síndrome X (también denominado síndrome metabólico) poseen una alta posibilidad de desarrollar enfermedades cardiovasculares. De esta forma queda claro entonces, que el tratamiento de la insulino- resistencia posee efectos beneficiosos no sólo para individuos con DM tipo 2, sino también para aquellas personas no diabéticas que padezcan síndrome X en cualquiera de sus manifestaciones (Olefsky, 2000).

Pese a los continuos esfuerzos en dilucidar el mecanismo específico responsable de la resistencia a la insulina a nivel celular, el mismo no ha sido aun aclarado completamente. Sin embargo, las investigaciones sugieren que las principales causas de la insulinoresistencia, están asociadas con una disminución del número de receptores de insulina y/o fundamentalmente, con alteraciones a nivel del complejo conjunto de señales de transducción post-receptor (Kahn, 1994; Virkamäki, 1999). Existen además evidencias de que tanto en la DM tipo 2 como en la obesidad, este defecto estaría asociado a alteraciones en la síntesis del principal

transportador de glucosa sensible a la insulina (GLUT-4), a su translocación hacia la membrana, o a ambos aspectos (De Fronzo, 1997; Kahn, 1992; Shepherd, 1999).

Principales parámetros en la regulación morfológico-funcional del páncreas endocrino.

Como hemos mencionado previamente, tanto la variación en la masa celular B como la alteración de su función y los respectivos mecanismos involucrados, conforman dos de los aspectos más estudiados con relación a la DM. Numerosos trabajos en el área morfológica sugieren que una posible explicación del déficit insulínico estaría dado por un desequilibrio de la masa celular B (Finegood y col., 1995; Pick y col., 1998; Bonner-Weir, 2000).

En los últimos años, muchos de los estudios en el área se focalizaron sobre los mecanismos proliferativos, de diferenciación y de muerte celular (apoptosis) de la población B, bajo diferentes condiciones experimentales, con la finalidad de comprender la dinámica de esta población celular, clave en la evolución de la DM.

Básicamente se pueden establecer cuatro parámetros fundamentales que estarían involucrados en la regulación de la población B:

1. *Replicación* de células B preexistentes,
2. *Neoformación* a partir de células precursoras indiferenciadas,
3. Muerte celular (*apoptosis*),
4. Variaciones en el tamaño celular (*atrofia e hipertrofia*).

El número de células B estaría determinado por el balance entre la renovación celular, ya sea por replicación de células preexistentes o por diferenciación a partir de células ductales, y la muerte de dichas células (Finegood y col., 1995).

Se ha demostrado que durante la etapa final de la gestación y en el primer período de la vida postnatal, la mayoría de las células insulares se forman por *neogénesis* o *nesidioblastosis*, es decir, la formación de *clusters* o nidos de células endocrinas originadas a partir del epitelio ductal. Avanzado el período postnatal, las células insulares son ya células altamente diferenciadas y con muy poca capacidad de proliferación. De hecho, muchos han asumido que la masa celular B no se renueva significativamente y que por lo tanto, cada organismo nace con la cantidad de células B que tendrá el resto de su vida. Sin embargo, este razonamiento ignora que en la mayoría de los roedores y en el resto de los mamíferos adultos, la población B continúa creciendo muy lentamente (Bonner-Weir, 2000). Así, aunque nunca pudo ser demostrado con certeza, se ha sugerido que la replicación de las células B sería suficiente para garantizar el crecimiento de la masa celular B durante

el período postnatal. Por otra parte, Bouwens *y col.* (1998), sostiene que las células B tienen una muy limitada capacidad proliferativa, hecho reflejado en los inútiles esfuerzos por expandir dicha población en cultivo. Más recientemente, el mismo grupo de trabajo demostró que las células B humanas son aun menos replicativas que en los roedores, por lo que las definen en este caso como “no proliferativas” (post-mitóticas) (Bouwens *y col.*, 1997; Lefebvre *y col.*, 1998).

Por lo tanto, no se puede descartar el rol de la neogénesis en el mantenimiento del número de células B en la vida adulta. De hecho la presencia de pequeños grupos celulares asociados a los ductos, se ha interpretado en distintas oportunidades como una evidencia de neogénesis (Bendayan, 1987; Bouwens, 1998; Park *y col.*, 1993).

Además, distintos modelos experimentales en roedores han demostrado que las células B pueden regenerarse y/o expandirse después de alguna injuria tisular, (ej.: pancreatectomía parcial, ligadura ductal, etc.) (Bouwens, 1998; Slack, 1995). Existe un amplio consenso en considerar que tal mecanismo regenerativo es el resultado de un proceso de diferenciación celular o neogénesis.

Sin embargo, aun queda por comprender totalmente los mecanismos específicos y los diferentes factores inductores que definen el tipo celular progenitor. En este sentido, es necesario establecer si estas células ductales son verdaderas células madre ó células madre “facultativas”, es decir células que ya diferenciadas pueden readquirir un fenotipo multipotencial luego de replicarse. De acuerdo a las observaciones de Bonner-Weir (2000), la segunda propuesta sería la más viable. Posteriormente, estímulos externos como factores solubles y/o componentes de la matriz, direccionarían su diferenciación final en un fenotipo acinar, endocrino ó ductal diferenciado (Bonner-Weir, 2000).

Por otra parte, Bouwens (1998) plantea la no existencia de células madre ó protodiferenciadas y sugiere un mecanismo de trans-diferenciación para la regeneración de células insulares. Este mecanismo, a diferencia de un proceso de neogénesis a partir de células madre, involucra células diferenciadas. Este consiste en la reprogramación de la expresión de ciertos genes, lo que representaría una vía intermedia hacia la desdiferenciación. De esta manera, ciertas células diferenciadas retendrían la capacidad de activar un grupo de genes y desactivar otro, fundamentales en la definición del fenotipo celular.

En resumen: a) la posibilidad de que existan verdaderas células madre en el adulto, aun no ha sido probada; b) existen fuertes evidencias de que las células

exocrinas pueden desdiferenciarse a células de tipo ductal, posiblemente protodiferenciadas; c) Existen además, evidencias de que las células exocrinas pueden trans-diferenciarse a células endocrinas.

Un parámetro adicional, involucrado en la regulación del tamaño celular, está representado por la *hipertrofia-atrofia* celular. Este parámetro ha sido poco estudiado y aparentemente estaría regulado por estímulos nutricionales. La estimulación por la glucosa incrementa el tamaño celular B, asociado a cambios ultraestructurales en relación al aumento de la secreción de insulina. Por ello, la hipertrofia podría representar una adaptación al incremento en la demanda insulínica, aunque resulta evidente que la compensación debida a hipertrofia es una solución limitada (Swenne, 1992). La hipertrofia de las células representaría una rápida respuesta ante una demanda metabólica, permaneciendo detenidas en G₁ o en G₂ de acuerdo a la situación y al tipo celular. Esta detención en G₁ – G₂, permitiría una amplificación sostenida de la expresión génica sin necesidad de una posterior división celular, favoreciendo el aumento en el tamaño celular (Preisig, 1999, Liu y col., 1999).

Por último, el otro factor regulador de la masa celular B, es la muerte celular programada o *apoptosis*. Este fenómeno representa la propiedad de la mayoría, sino de todas las células, de activar una serie de mecanismos “suicidas”, de acuerdo a las diferentes circunstancias con las que una célula puede enfrentarse. La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que ocurre normalmente, tanto en los procesos de desarrollo y organogénesis, como así también en la función inmunitaria y el crecimiento de los tejidos. No obstante, en muchas ocasiones puede ser inducida por diferentes estímulos patológicos (Carson y col., 1993; Cummings y col., 1997; Kerr y col., 1987; Steller, 1995). Esta muerte celular programada se manifiesta a través de una condensación celular, tanto a nivel citoplasmático como nuclear y la fragmentación del ADN. A medida que el proceso avanza, la condensación se acentúa y las células frecuentemente se fragmentan en cuerpos celulares residuales rodeados de membrana, denominados “cuerpos apoptóticos”, los que son rápidamente fagocitados por macrófagos ó células vecinas (Steller, 1995; Thompson, 1995, 1998, 1999). A diferencia de la necrosis, la muerte por apoptosis se caracteriza por ser una autodigestión controlada de la célula. La necrosis en cambio, representa una forma de muerte celular patológica, producto de una injuria aguda sufrida por dicha célula y se caracteriza, a diferencia de la apoptosis, por una rápida descompensación y lisis celular, ocasionando de esta

manera una reacción inflamatoria.

De esta manera, la apoptosis representaría en el páncreas, al igual que en otros tejidos, el principal mecanismo de remoción celular, tanto en condiciones normales como de estrés o patológicas (Bonner-Weir, 2000; Chandra *y col.*, 2001; Hanke, 2000; Mandrup-Poulsen, 2001; Pick *y col.*, 1998; Scaglia *y col.*, 1997).

Podemos resumir entonces, diciendo que todas estas variables están íntimamente asociadas a los cambios funcionales en el páncreas durante la vida del organismo, tales como su sensibilidad a la glucosa y consecuentemente la capacidad de síntesis y/o secreción de la insulina en respuesta a aquélla.

Así, el conocimiento de los distintos factores que regulan el proceso de diferenciación, proliferación y muerte celular del páncreas, y en particular de la población secretora de insulina, representa un área de vital interés en el estudio de la etiopatogenia y terapéutica de la diabetes.

Modelos animales utilizados para el estudio de la Diabetes Mellitus

Existen numerosos y diversos modelos experimentales que intentan explicar la dinámica de la población B y el complejo mecanismo que regula la síntesis, secreción y acción de la insulina, en relación con el desarrollo de la patología diabética.

Algunas cepas desarrollan una DM tipo 1 espontáneamente, como consecuencia de una respuesta autoinmune contra las células B. Estos modelos, particularmente la rata Biobreeding (BB) y el ratón diabético no obeso (NOD), han sido intensamente estudiados en las dos últimas décadas, contribuyendo de forma sustancial a la comprensión de la etiología autoinmune de esta enfermedad (Homo-Delarche, 2001; McDuffie, 1998; Shafrir, 1992, 1999).

Por otra parte, las especies con síndromes tanto espontáneos como inducidos, que desarrollan una DM tipo 2, son mucho más numerosos y diversos que los afectados por una DM tipo 1. Esta diversidad está dada tanto en términos de origen y desarrollo, como de manifestaciones y patogénesis de la enfermedad (Shafrir E, 1992). A su vez, en muchos animales este tipo de DM está asociado a la obesidad, llegando incluso a referirse algunos autores como "diabesidad", contracción de diabetes y obesidad, dada la íntima asociación de estas dos patologías. Como señalamos anteriormente, en algunas especies, la primera manifestación diabética es el inadecuado reconocimiento celular de la insulina, probablemente relacionado a alguna alteración a nivel del receptor de insulina. En muchos casos, esta condición es compensada, al menos en parte, por un incremento sostenido en la secreción de

insulina. Así, muchos animales se mantienen en esta condición durante toda su vida, gracias a la plasticidad y resistencia de su páncreas endocrino. Sin embargo, otros son incapaces de sostener dicha condición, sucumbiendo a la situación de hiperglucemia crónica, lo que consecuentemente ocasiona una degeneración progresiva del tejido endocrino, producto de la sobrecarga funcional. En muchos casos esta situación conduce a una etapa de insulino-dependencia, dado el deterioro y/o disminución que presenta el tejido secretor de insulina.

Entre los modelos de DM tipo 2 más estudiados, ampliamente revisados por Shafrir E. (1992) y Shafrir y col. (1999), se encuentran: el ratón obeso (*ob/ob*), el diabético (*db/db*), las diferentes líneas de la rata Zucker: la obesa (*fa/fa*) y la diabética obesa (ZDF/Drt-*fa*), la rata Wistar: Wistar-Kyoto diabetic: WDF-TA-*fa*, Wistar-Kyoto fatty: WKY/Ndrt-*fa*, las líneas de ratas corpulentas (SHR/N-*cp* y Lan-*cp*), la rata del desierto (*Psammomys obesus*), el mono reshus (*Macaca mulata*), la rata Goto-Kakizaki (GK) y otros modelos más recientes como la rata OLETF, y la eSS que representa una de las líneas madre de la cepa eSMT, cuya descripción y caracterización forma parte del presente trabajo de tesis.

Rata eSS

La línea eSS deriva de una cepa de ratas albinas denominada IIM. Esta cepa fue establecida por B. Houssay en Buenos Aires y en 1948 un grupo de ellas fue trasladado al Instituto de Investigaciones Médicas de Rosario. La familia fundadora (IIM) fue dividida al azar en varias líneas: a, b, c, etc. Así pequeños grupos de la línea IIMe y IIM α (esta última obtenida de la F₁ axd) fueron a su vez transferidos a la Facultad de Medicina (Fm) de la Universidad de Rosario.

Durante 1978 se detectó que algunos machos manifestaban hiperglucemia en ayunas, por lo que se decidió el estudio de la colonia completa. A esta línea se la llamó eSS (e Stilmann Salgado), cuya completa denominación es IIMe/Fm eSS. La línea IIM α fue utilizada como control. Una vez confirmadas estas primeras observaciones, los estudios posteriores mostraron que la cepa eSS se caracterizaba por una progresiva intolerancia a la glucosa, más severa en los machos, y una leve insulinoresistencia e hiperinsulinemia, acompañada de un fenotipo ausente de obesidad (Martinez y col., 1993; Shafrir E, 1992).

Entre los años 1986 y 1990 algunos ejemplares machos de la línea eSS y α fueron trasladados al CENEXA (Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada) ubicado en la Facultad de Ciencias Médicas de La Plata, para completar estudios

sobre la morfofisiología de esta línea diabética espontánea. Los estudios morfológicos fueron realizados sobre los páncreas de animales machos de 1, 6 y 18 meses de edad. A la edad de 6 meses se detectaron marcadas alteraciones en la histoarquitectura del páncreas, evidenciado por grandes áreas de fibrosis y una disrupción de los islotes, conformando grupos de células dispersas entre el tejido exocrino y la fibrosis intersticial. En cuanto a la morfometría celular, dichos estudios mostraron un aumento significativo en la población B, cuando se los comparó con la línea control, y un descenso correlativo en las células A, en los animales de 6 meses. Contrariamente, a los 18 meses la población secretora de insulina descendió significativamente y las células D aumentaron. En cuanto a los cambios morfológicos, la disrupción apareció incrementada junto a la fibrosis del estroma pancreático (Martinez *y col.*, 1993; Gómez Dumm *y col.*, 1989).

Rata eSMT

Esta línea (IIMe/Fm eSMT) recientemente descrita (Tarrés *y col.*, 2000), deriva de la cruce entre dos cepas endocriadas pertenecientes al stock IIM: la línea eSS, descrita anteriormente, y la β . Esta última es una cepa de ratas moderadamente obesas (Calderari *y col.*, 1995) mientras que la eSS, como ya hemos hecho referencia, es una línea que desarrolla una diabetes moderada sin relación con la obesidad (Martinez *y col.*, 1993).

Estudios preliminares mostraron que este modelo murino desarrolla espontáneamente un síndrome diabético tipo 2, relacionado con una obesidad moderada, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa y niveles de insulina elevados.

La caracterización de esta línea diabética forma parte del presente trabajo de tesis, en el que se analiza de manera secuencial el desarrollo del síndrome, comparándolo con un modelo murino de envejecimiento normal.

Lo que importa verdaderamente en la vida no son los objetivos que nos marcamos, sino los caminos que elegimos para lograrlos.

Peter Bamm

OBJETIVOS

Si bien existen numerosas teorías que intentan explicar el proceso de envejecimiento a través de diferentes hipótesis, la mayoría coincide en considerar que el paso del tiempo ocasiona un progresivo deterioro de los múltiples mecanismos de control, ya sea a nivel molecular, celular o sistémico. También ha quedado claramente expuesto en la Introducción, la naturaleza multifactorial de este proceso. Sin embargo, algunos autores cuestionan si el deterioro metabólico es atribuible a estados de enfermedad o patologías específicas, o es inherente al proceso mismo del envejecimiento. Dicho de otra forma, cómo podemos determinar la incidencia de uno u otro componente en la muerte de un organismo en forma aislada. ¿Se envejece a causa del deterioro, o los organismos simplemente envejecen y como consecuencia se deterioran? Aunque estos interrogantes exceden los objetivos del presente trabajo, es importante destacarlos ya que representan la base conceptual de la gerontología moderna.

De acuerdo a lo ya expuesto sobre el impacto del envejecimiento en el sistema neuroendocrino, más precisamente a nivel del páncreas endocrino, y dada la vinculación estrecha que guardan ciertas formas de diabetes tipo 2 con los procesos asociados a la edad avanzada, creímos que el análisis comparativo entre diferentes edades de una cepa murina normal y una diabética espontánea, aportaría información valiosa en relación al comportamiento del páncreas endocrino y en particular sobre la población B, en las diferentes edades de los animales. De acuerdo a ello, los objetivos del presente trabajo se pueden enumerar de la siguiente manera:

- ❖ Identificar la secuencia de cambios que se suceden en la histofisiología del páncreas endocrino durante el envejecimiento, en un modelo normal y un modelo de diabetes espontánea (eSMT), enfocando el estudio en el comportamiento de las diferentes poblaciones endocrinas, con especial referencia a las células productoras de insulina.
- ❖ Determinar, mediante morfometría digital y empleando parámetros estereológicos específicos, la inmunorreactividad diferencial cuantitativa de las diferentes poblaciones endocrinas en ratas normales y diabéticas (eSMT) de diferentes edades.

- ❖ Determinar la concentración plasmática de glucosa, triglicéridos, colesterol, insulina, y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), y correlacionar dichas variables con los cambios histomorfológicos antes mencionados.
- ❖ Identificar células endocrinas en estado replicativo mediante la determinación inmunohistoquímica del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), con el objeto de asociar posibles procesos de reposición celular en relación con las diferentes edades o estados de envejecimiento.
- ❖ Contribuir a la caracterización de la cepa eSMT, con el fin de proporcionar una base experimental que posibilite el avance en el estudio de los mecanismos de la patología diabética tipo 2.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

En una primera etapa de los estudios, se emplearon ratas normales machos pertenecientes a la cepa Sprague-Dawley (SD) de las siguientes edades: jóvenes (J, 4 meses), viejas (V, 24 meses) y seniles (S, 30 meses), obtenidas del bioterio de la Cátedra de Histología y Embriología "B" de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM) de la UNLP.

A raíz de los resultados obtenidos en esa primera instancia, asociados a observaciones preliminares realizadas en una cepa diabética espontánea, se planteó un análisis más completo y comparativo entre ambas líneas murinas. Para tal fin, se utilizaron nuevamente ratas normales machos pertenecientes a la cepa SD de las tres edades referidas (J, V y S) (6 animales por grupo, $n=6$) provenientes del mismo bioterio de la Cátedra de Histología y Embriología "B" de la FCM de la UNLP; y ratas machos de la cepa eSMT (con diabetes espontánea y obesidad moderada) de diferentes edades (2, 5, 10, 14, 18 meses) tomando 5 animales por grupo etéreo ($n=5$). Estas últimas, originarias de la FCM de la Universidad Nacional de Rosario (UNR), fueron cedidas por el grupo de investigadores de la Cátedra de Biología de dicha Facultad, y sus características han sido expuestas en la Introducción del presente trabajo (pág. 50, 51). Las ratas SD se mantuvieron en el bioterio a una temperatura promedio de 22 °C, bajo ciclos de luz - oscuridad de 12 hs. En cuanto a las ratas eSMT, éstas fueron criadas en condiciones semejantes en el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNR. En ambos casos, los animales fueron alimentados con alimento balanceado comercial y agua *ad libitum*. Cabe destacar que los animales diabéticos fueron sacrificados en el laboratorio de la Cátedra de Histología y Embriología "B" de la Fac. de Medicina de la UNLP, para lo cual fueron trasladados en jaulas de transporte y mantenidos durante una semana en el bioterio local, a fines de normalizarlos, previo al sacrificio.

Los animales fueron sacrificados mediante decapitación, a medida que alcanzaron las edades respectivas en cada grupo. A cada animal se le extrajo la cola del páncreas inmediatamente para evitar la autólisis del tejido y se recolectó la sangre troncal para los posteriores estudios plasmáticos.

ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

Procesamiento histológico

El material fue fijado en líquido de Bouin, y posteriormente incluido en parafina. Se realizaron cortes seriados de 4 μm de espesor, a diferentes niveles del bloque, con micrótopo de deslizamiento, coloreándose con hematoxilina-eosina y tricrómico de Gomori para las observaciones generales de rutina. Sobre la base de lo observado se seleccionaron los cortes para las marcaciones específicas.

Inmunohistoquímica

Los cortes seleccionados se procesaron de la siguiente manera:

1. Se desparafinaron en baño de xilol durante 15 minutos.
2. Se hidrataron en pasajes sucesivos por soluciones de alcohol etílico: 100° - 96° - 70° - H₂O destilada - buffer fosfato PH 7.2 (PBS) (dos baños de c/u).
3. Se incubaron durante 30 minutos en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno, para el bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena.
4. Se efectuaron dos lavados en PBS de 5 minutos c/u.
5. Se incubaron durante otros 30 minutos con suero normal de cabra para evitar reacciones de pegado inespecíficas.
6. Se incubaron durante toda la noche a 4° C, con los anticuerpos primarios específicos, para la detección de insulina, glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático (listos para usar de Lab. Biogenex San Ramon, CA, USA) y antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (dil: 1:100, Lab. Santa Cruz Biotech, USA). En todos los casos se realizaron controles para evitar falsos positivos (especificidad del anticuerpo primario): a) sin anticuerpo primario (PBS); b) sin anticuerpo primario bloqueado con el suero normal correspondiente a la especie de origen.
7. Dos lavados en PBS de 5 minutos c/u.
8. Por último los cortes se incubaron con un complejo anticuerpo 2° -avidina-biotina-peroxidasa (sistema ABC de Lab. Santa Cruz Biotech, USA), ó con el Ac 2° biotinilado y luego una solución de estreptavidina-fosfatasa alcalina (sistema LSAB de Dako).
9. Para revelar se empleó diaminobencidina, diaminobencidina + sulfato de níquel-amonio (Shu y col., 1988), y fucsina roja, según los casos.

Análisis morfométrico

Los estudios morfométricos se efectuaron mediante un sistema de video microscopia (software OPTIMAS – Image J 1.23 National Institute of Health, USA), obteniéndose diferentes variables estereológicas, para establecer relaciones porcentuales de cada tipo celular (A, B, D y PP), tomando como áreas de referencia el páncreas total y el páncreas endocrino.

Para este propósito se realizaron inmunomarcaciones en cortes seriados para las cuatro hormonas y para cada uno de los niveles previamente definidos. Las secciones fueron capturadas mediante una videocámara Sony (sistema PAL) y convertidas a la norma RGB para posibilitar su digitalización y posterior procesamiento. Por cada corte se seleccionó una imagen por islote detectado (un número promedio de 15 imágenes por corte) dependiendo del tamaño y cercanía de los islotes, empleando, para este fin, un objetivo de X 25. Para tener la seguridad de que se estaban analizando islotes, se tomó como límite mínimo para la obtención de imágenes un diámetro insular de 40 μm , evitando considerar cortes superficiales de los mismos y/o pequeños grupos de 4 o 5 células aisladas. El criterio detallado fue aplicado sólo para las ratas SD y algunos animales eSMT de 2 meses, debido a que a partir de los 5 meses de edad, las ratas eSMT presentaron una marcada y progresiva disrupción insular, desapareciendo de esta manera los islotes como unidad morfológica de referencia y originando como consecuencia, un patrón irregular de distribución de las células endocrinas. Por lo tanto, para el procesamiento de los páncreas de la cepa eSMT, fue necesario capturar un mayor número de imágenes para poder registrar la totalidad de las células endocrinas detectadas en cada corte histológico.

Todas estas mediciones, tanto en la cepa normal como en la eSMT, fueron procesadas y registradas automáticamente, luego de lo cual, se calcularon los siguientes parámetros:

- Densidad de volumen ($DV = \Sigma \text{ área celular} / \text{área de referencia (AR)}$)
- Densidad de células ($DC = \text{número de células} / \text{AR}$).
- N° de islotes / AR
- Tamaño insular (μm^2)
- Área celular promedio
- Área adiposa (μm^2)

Tanto la DV como la DC fueron referidas a dos AR diferentes: una AR endocrina (AR_e) y una AR pancreática total (AR_t). AR_e representa el área endocrina total en

cada sección, sobre la cual se calcularon los valores de las diferentes poblaciones insulares. Luego, con la suma de las áreas de cada población insular, referidas a su AR_e , se obtuvo la respectiva DV, cuyo valor es usualmente aceptado de acuerdo a la morfología clásica, como representativo de la masa celular.

El número de células se obtuvo dividiendo el área inmunomarcada de cada población endocrina por el área celular promedio del respectivo tipo celular. Para calcular este valor promedio, se midieron 100 células por cada población insular.

A su vez, se calculó la DV del páncreas endocrino y la DV de la población B, A, D y PP, tomando al páncreas total como área de referencia (AR_t). Para esta AR_t , se obtuvo una imagen panorámica de cada sección, empleando un objetivo X 2,5 para poder abarcar la totalidad del perímetro glandular, cuyo delineado incluyó el tejido adiposo intraglandular y excluyó el tejido conectivo interlobular, los vasos y nervios de gran tamaño y la adiposidad extraglandular.

También se midió el tamaño insular (μm^2) y el número de islotes por cada sección. Este último se calculó referido al páncreas total (μm^2). Todos estos datos fueron calculados teniendo en cuenta la totalidad de los islotes hallados en cada corte de cada grupo experimental.

Para la evaluación del tejido adiposo intraglandular se calculó la DV, tomando el páncreas total como AR. Los valores de este último parámetro fueron expresados en forma logarítmica, debido a que de forma lineal los datos de los animales jóvenes y viejos no eran lo suficientemente elevados para entrar en la escala del gráfico correspondiente.

Finalmente se contabilizó la cantidad de núcleos de células insulares PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) positivos en cada grupo experimental de la segunda etapa, con el fin de obtener un índice de replicación celular por cada grupo etéreo.

ESTUDIOS PLASMÁTICOS

En los primeros estudios efectuados en la cepa SD, sólo fue analizada la histología cuali-cuantitativa de los diferentes grupos, por lo tanto los análisis plasmáticos detallados a continuación, se refieren a la segunda etapa de los experimentos en ambas cepas murinas.

Previo a que los animales alcanzaran la edad de sacrificio, se efectuaron extracciones de sangre de la vena caudal, en forma periódica a intervalos de 4 meses, previa anestesia ligera con éter utilizando EDTA al 7% como anticoagulante.

Además, se recolectó la sangre troncal de cada animal sacrificado, completando así la totalidad de las muestras. Estas fueron luego centrifugadas a 2500 rpm y el plasma obtenido fue alicuotado, congelándose a -20°C para los posteriores dosajes de insulina y TBARS. Las determinaciones de los tenores de glucosa, triglicéridos y colesterol plasmáticos, se realizaron el mismo día de la extracción para evitar degradación enzimática que introdujera errores en las mediciones.

La glucemia fue determinada usando un kit comercial (Wiener Lab.) basado en el método de la glucosa oxidasa enzimática (GOD).

El nivel de triglicéridos se determinó empleando un kit comercial enzimático-colorimétrico GPO/PAPAA (Wiener Lab.).

Los niveles de insulina plasmática se determinaron mediante radioinmunoensayo (Herbert *y col.* 1965), empleando anticuerpos específicos comerciales (Linco Research, USA).

Los niveles de TBARS fueron medidos a través del método del ácido tiobarbitúrico (Ohkawa *y col.*, 1979), el que consiste en hervir a baño maría durante 1 hora los tubos con las muestras de plasma, el blanco (H₂O_d) y el estándar (malondialdehído), en presencia de ácido acético y ácido tiobarbitúrico. Luego de centrifugar a 2500 rpm, el sobrenadante se dispuso para ser leído su densidad óptica a 532 nm.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados morfométricos y plasmáticos se evaluaron estadísticamente mediante ANOVA multifactorial seguido por test de Tukey-Kramer para comparaciones múltiples. Los datos fueron procesados mediante un software estadístico (Statgraphics 6.0).

RESULTADOS

1. ENVEJECIMIENTO en Ratas normales (Sprague Dawley)

Estudios morfológicos

Con el objeto de tener una primera aproximación a las pautas de envejecimiento de nuestra población, se realizó un primer análisis morfológico sobre la base de material previamente recolectado en nuestro laboratorio. Posteriormente, luego de analizar estos resultados, se planteó un nuevo diseño teniendo en cuenta lo observado, con el propósito de estudiar con más detalle la evolución de la cepa, para lo cual se definieron las edades de sacrificio para las observaciones morfológicas y un muestreo secuencial para las principales variables plasmáticas.

Los resultados presentados aquí son representativos de ambos experimentos, el primero, morfológico y el segundo, que además de la histología, incluyó los estudios plasmáticos.

El resultado de las observaciones microscópicas reveló una distorsión progresiva en el parénquima y en el estroma pancreático de las ratas envejecidas (V y S; fig. 3.1 C,D,E,F; fig. 3.2 C,D,E,F; fig. 3.3), cuando se las comparó con el páncreas de ratas jóvenes (fig. 3.1 A,B; 3.2 A,B). El tejido adiposo intraglandular evidenció un marcado incremento en los animales de edad avanzada, a expensas de una disminución en el parénquima pancreático. En algunos animales V y en casi todos los S, se observó un polimorfismo insular con imágenes de islotes fragmentados de diferentes tamaños, como así también áreas de progresiva fibrosis intersticial (fig. 3.1 D, F; 3.2). La estructura ductal, también sufrió importantes alteraciones en los animales de mayor edad. Prueba de ello son la aparición de áreas de hiperplasia ductal tanto de tipo adenomatosa (fig. 3.3 A, F) como quística (fig. 3.1 E, F; 3.3 E), asociadas a la dilatación de la luz de los conductos (ectasia ductal). Como consecuencia de esto el epitelio cúbico simple, característico de las ratas más jóvenes, se hace notoriamente más bajo.

También se observó en los animales más envejecidos, un engrosamiento de la membrana basal de las células ductales, sumado a una intensa eosinofilia de la misma (fig. 3.3 D). A nivel de los vasos sanguíneos se detectaron imágenes de arterioesclerosis evidente, sobre todo en aquellos de mayor calibre (3.3 C).

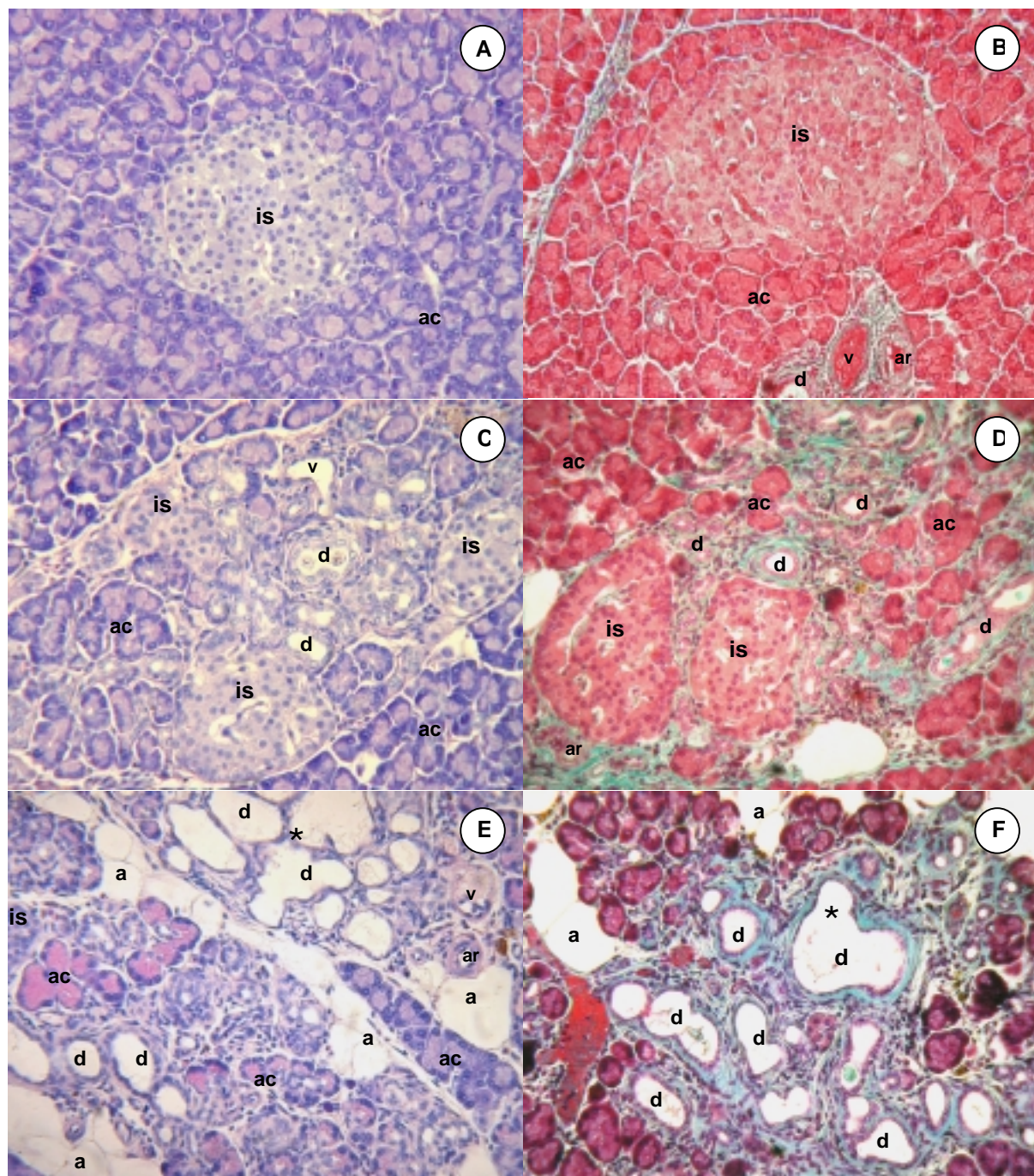


Figura 3.1. Páncreas de ratas SD jóvenes, viejas y seniles. A,B: rata joven, C,D: rata vieja, E,F: rata senil. is: islotes, ac: acinos, a: adipocitos, d: ducto, ar: arteriola, v:venula, asteriscos: ductos dilatados (ectasia ductal). En verde: tejido conectivo (fibrosis intersticial). A,C,E: Hematoxilina y eosina; B,D,F: Tricrómico de Gomori. (x200).

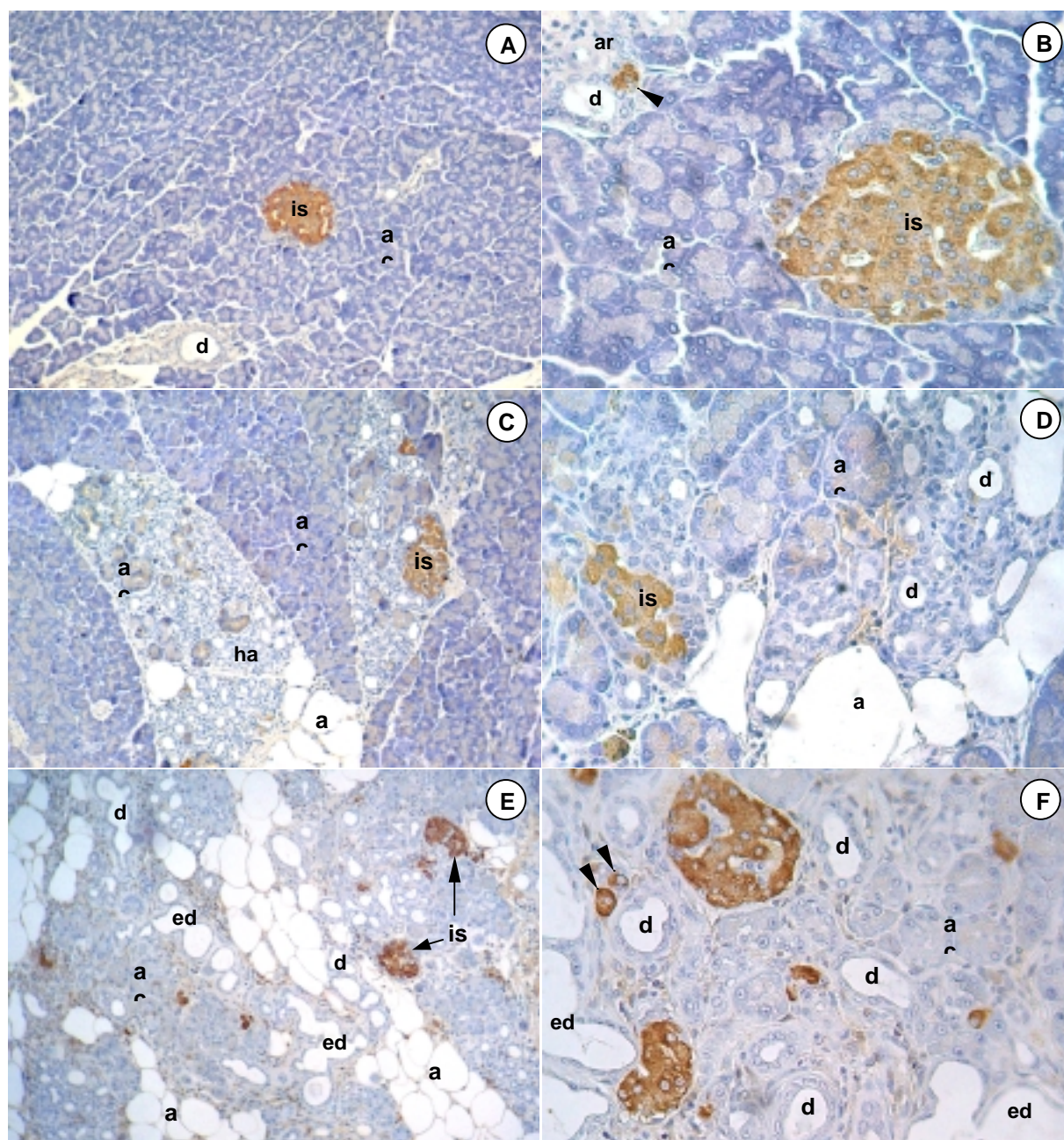


Figura 3.2. Inmunohistoquímica para la detección de insulina en páncreas de ratas SD jóvenes, viejas y seniles. A,B: rata joven; C,D: rata vieja; E,F: rata senil. a: adipocitos, ac: acinos, ar: arteriola, d: ducto, ed: ectasia ductal, ha: hiperplasia ductal adenomatosa, is: islotes, punta de flecha: célula B asociada a ductos. A,C,E: x100; B,D,F: x400.

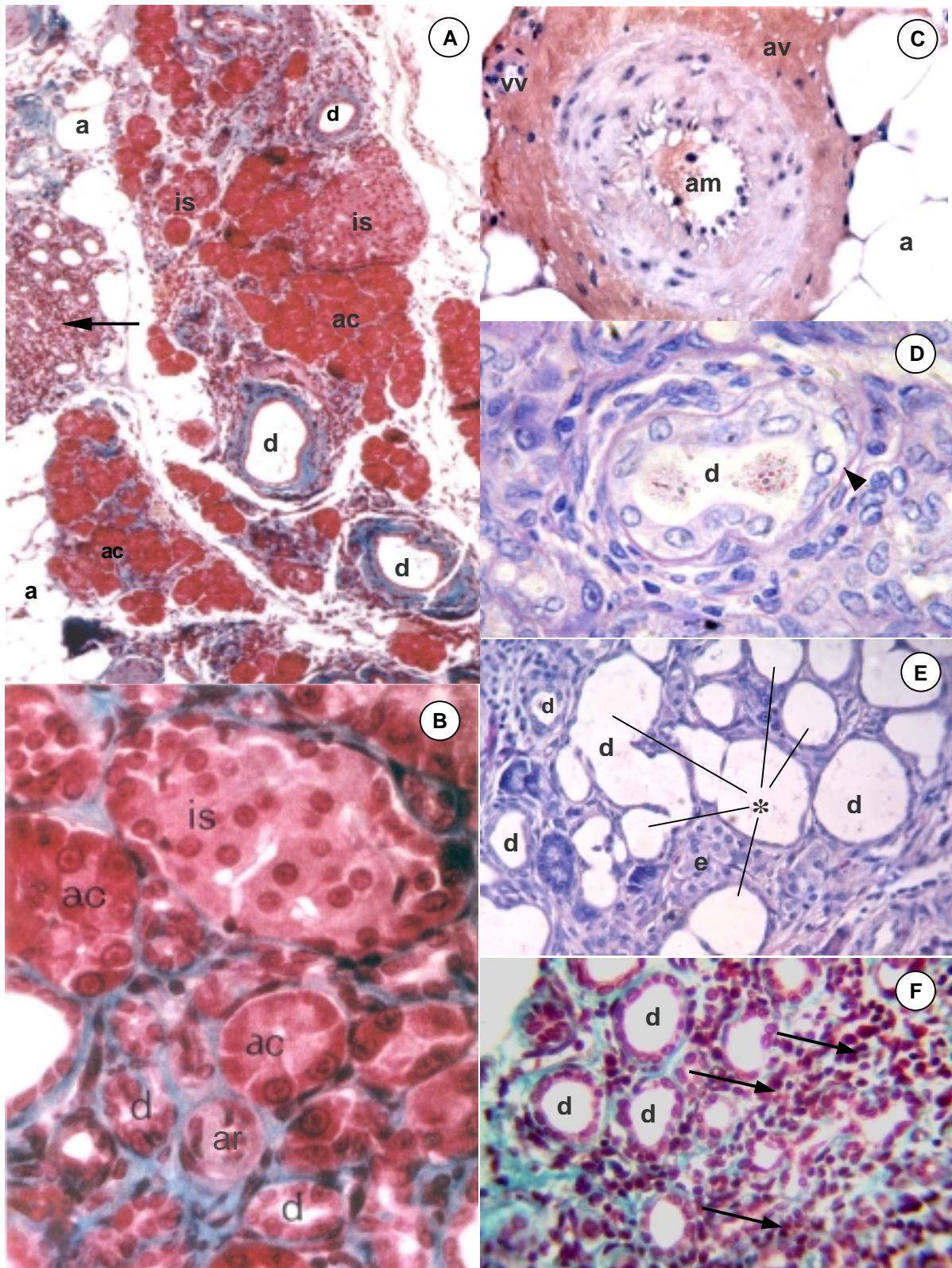


Fig. 3.3. Alteraciones estructurales en animales viejos y seniles. A. Páncreas de una rata S (Tricrómico de Gomori, x100); B. Páncreas rata V (Tricrómico de Gomori, x400); C. Arteria muscular engrosada (rata S, HyE, x400); D. Detalle membrana basal ductal engrosada (rata V, HyE, x800); E. Páncreas rata V (HyE, x400); F. Páncreas rata S, (Tric. de Gomori, x400). a: adipocitos, ac: acino, am: arteria muscular, av: adventicia ar: arteriola, is: islotes, d: ducto, vv: vasa vasorum, asterisco: hiperplasia ductal quística; flecha: hiperplasia ductal adenomatosa. Asteriscos: Ectasia ductal asociada a fibrosis.

Análisis morfométrico

Cuando se compararon los valores de DV y DC entre las diferentes edades para cada población celular, respecto al área endocrina (AR_e), el análisis del páncreas endocrino mostró diferencias significativas en las poblaciones B y D. Mientras que en las células secretoras de insulina las diferencias estuvieron representadas por un incremento significativo ($p < 0.05$) de la DV ($76,53 \pm 3,75$) y DC ($87,71 \pm 4,30$) en los animales seniles respecto de las ratas jóvenes ($DV = 65,13 \pm 1,45$; $DC = 74,64 \pm 1,66$) la población D mostró un descenso significativo ($p < 0.05$) en la DV y DC de los dos grupos envejecidos (V: $DV = 1,95 \pm 0,35$; $DC = 4,73 \pm 0,86$ y S: $DV = 1,62 \pm 0,16$; $DC = 3,93 \pm 0,39$) respecto al grupo de animales jóvenes ($DV = 3,17 \pm 0,44$;

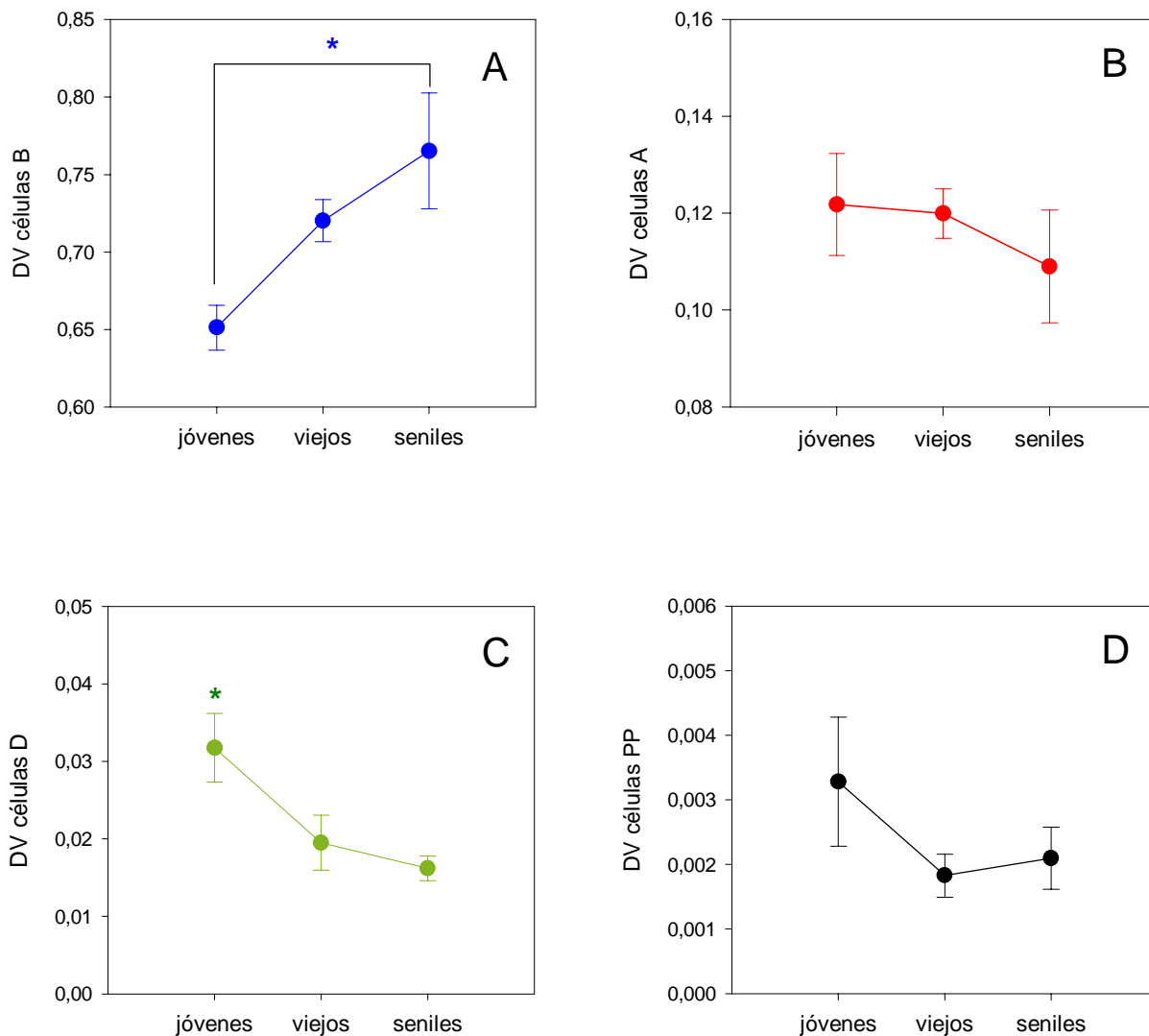


Figura 3.4. Densidad de volumen (DV_e) de las poblaciones B, A, D y PP en animales jóvenes, viejos y seniles. Los valores expresan la media \pm el ES. $n = 6$; * = $p < 0,05$

DC= $7,70 \pm 1,07$) (Fig. 3.4).

Cuando los valores fueron referidos al páncreas total (AR_t) (tabla 1), la DV y la DC de la población B de las ratas viejas fueron significativamente superiores respecto de sus equivalentes en ratas jóvenes ($p < 0.05$), no habiéndose detectado diferencias entre las poblaciones de ratas V y S.

Respecto al análisis de la proporción de tejido endocrino (PE), pese a hallar un aumento en la DV de los animales S en comparación con los otros grupos etáreos, no se detectaron diferencias significativas entre las diferentes edades. (tabla 1).

	Pob. celular	Jóven	Viejo	Senil	Valor P
DV ($\times 10^{-4}$)	B	$25,59 \pm 6,49$	$66,65 \pm 15,82$	$47,20 \pm 7,19$	V vs J = $p < 0.05$
	A	$9,65 \pm 3,37$	$10,10 \pm 1,32$	$13,49 \pm 2,53$	NS
	D	$1,77 \pm 0,43$	$0,93 \pm 0,07$	$1,57 \pm 0,39$	NS
	PP	$0,33 \pm 0,11$	$0,12 \pm 0,06$	$0,15 \pm 0,04$	NS
DC ($\times 10^{-6}$)	B	$29,34 \pm 7,43$	$76,39 \pm 18,14$	$51,81 \pm 8,25$	V vs J = $p < 0.05$
	A	$20,52 \pm 7,16$	$21,66 \pm 2,80$	$28,69 \pm 5,38$	NS
	D	$4,28 \pm 1,06$	$2,25 \pm 0,16$	$3,81 \pm 0,95$	NS
	PP	$1,23 \pm 0,37$	$0,43 \pm 0,23$	$0,57 \pm 0,14$	NS

DV ($\times 10^{-4}$)	PE	Jóven	Viejo	Senil	Valor P
		$73,06 \pm 9,98$	$76,65 \pm 10,03$	$88,43 \pm 9,28$	NS

Tabla 1. Datos morfométricos de las poblaciones celulares endocrinas y del tejido endocrino total en ratas jóvenes, viejas y seniles referidos al páncreas total. DV = densidad de volumen, DC = densidad de células, PE = páncreas endocrino, Area de referencia: páncreas total (AR_t). Cada valor representa la media \pm ES, NS: No significativo, n = 6

El área media insular (fig. 3. 5), resultó incrementada en las ratas V, cuando se comparó con animales J. Cuando se analizó el número de islotes, las ratas S mostraron un aumento significativo con relación al grupo de las ratas V.

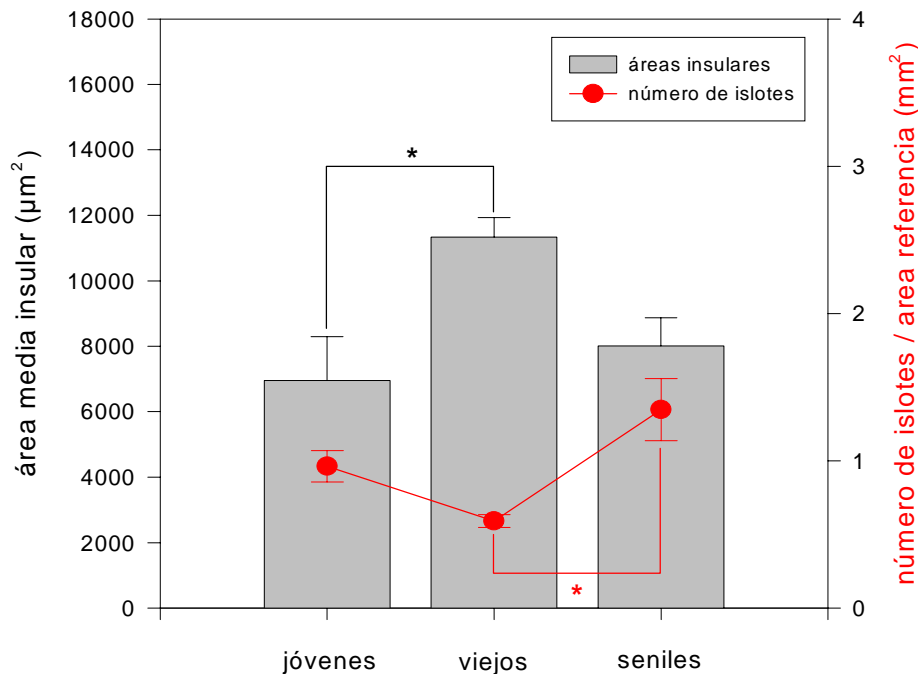


Figura 3.5. Área media insular y número de islotes en ratas jóvenes, viejas y seniles. Los valores expresan la media \pm el ES. $n = 6$; * = $p < 0,05$

También se analizó el área media celular de la población B, la que no arrojó diferencias significativas entre las diferentes edades. Por último, se comparó la proporción de tejido adiposo presente en el páncreas entre los diferentes grupos etáreos (fig. 3.6).

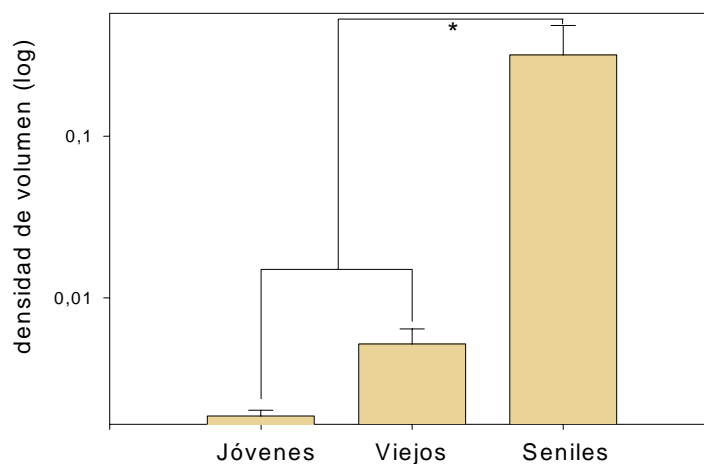


Figura 3.6. Tejido adiposo en páncreas de ratas jóvenes, viejas y seniles. Los valores expresan la media \pm el ES. * = $p < 0,05$.

En las ratas S se detectó un incremento significativo en la DV de dicho parámetro respecto a los animales J y V, observándose ya en estos últimos una tendencia al aumento.

Replicación y diferenciación de las células endocrinas

La escasa y aislada presencia de núcleos inmunomarcados contra PCNA en las células insulares, resultó insuficiente para calcular un índice de replicación representativo, por lo que los datos presentados son de carácter exclusivamente cualitativo. Sin embargo, en los animales V y S, fue frecuente la detección de núcleos positivos contra PCNA en células ductales, como así también de figuras mitóticas en células del mismo epitelio y células inmunomarcadas asociadas a los ductos (fig. 3.7)

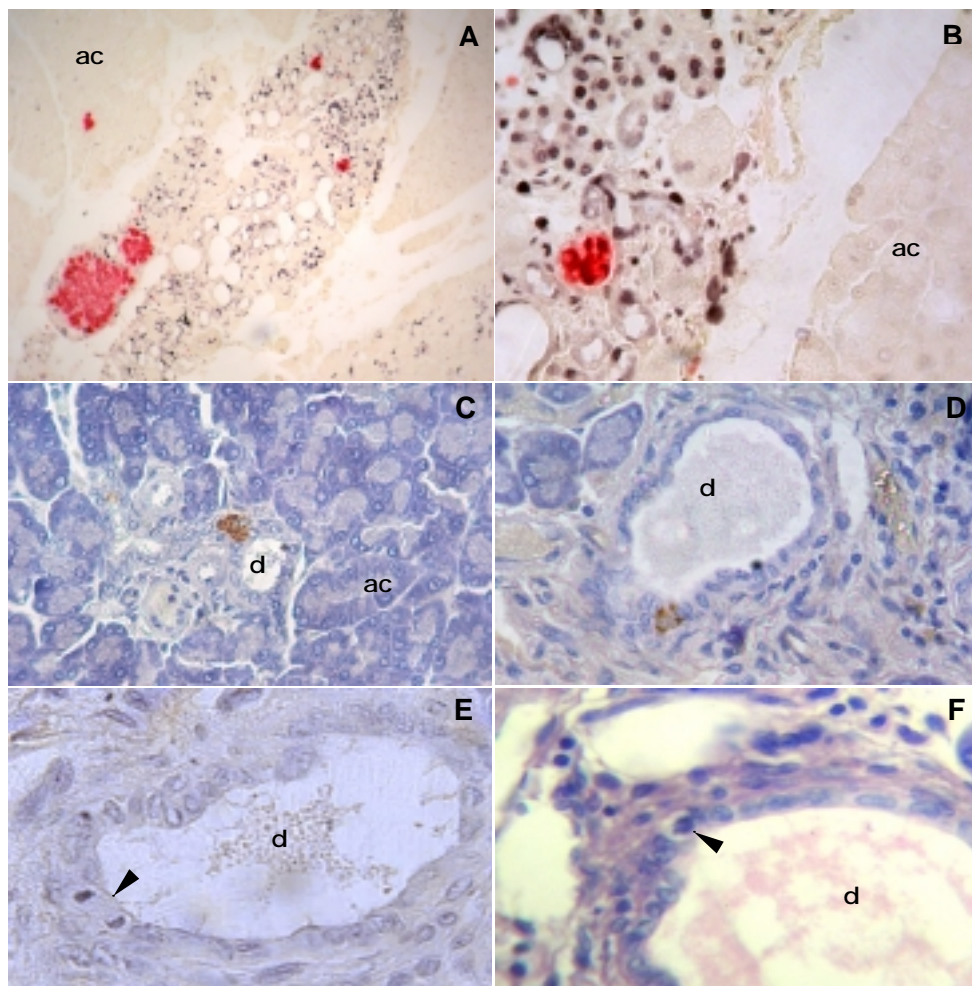


Fig. 3.7. A y B. Páncreas V. doble marcación: insulina (rojo), PCNA (negro) x100 (A) x 400 (B) Nótese las alteraciones circunscriptas a un lobulillo pancreático, con numerosas células ductales y acinares proliferando (positivas para PCNA). C. Páncreas V (x250) Célula del epitelio ductal positiva para insulina. D. Páncreas S (x250) Célula del epitelio ductal positiva para insulina. E. Páncreas V (inmuno c/contraste con H, x400). F. Ducto animal S (x400) Ref: ac: acinos, d: ducto; punta de flecha, fig. mitótica en el epitelio ductal.

Estudios plasmáticos

Niveles de glucosa e insulina

En la figura 3.8 se muestran las glucemias y las insulinemias plasmáticas en las diferentes edades analizadas. Los niveles de glucosa mostraron valores semejantes, salvo cuando se compararon los animales de 8 meses ($n=8$, $115,03 \pm 4,77$ mg/dl) y 24 meses (V, $n=17$, $94,12 \pm 3,47$ mg/dl), detectándose en los últimos, un descenso significativo ($p<0,05$).

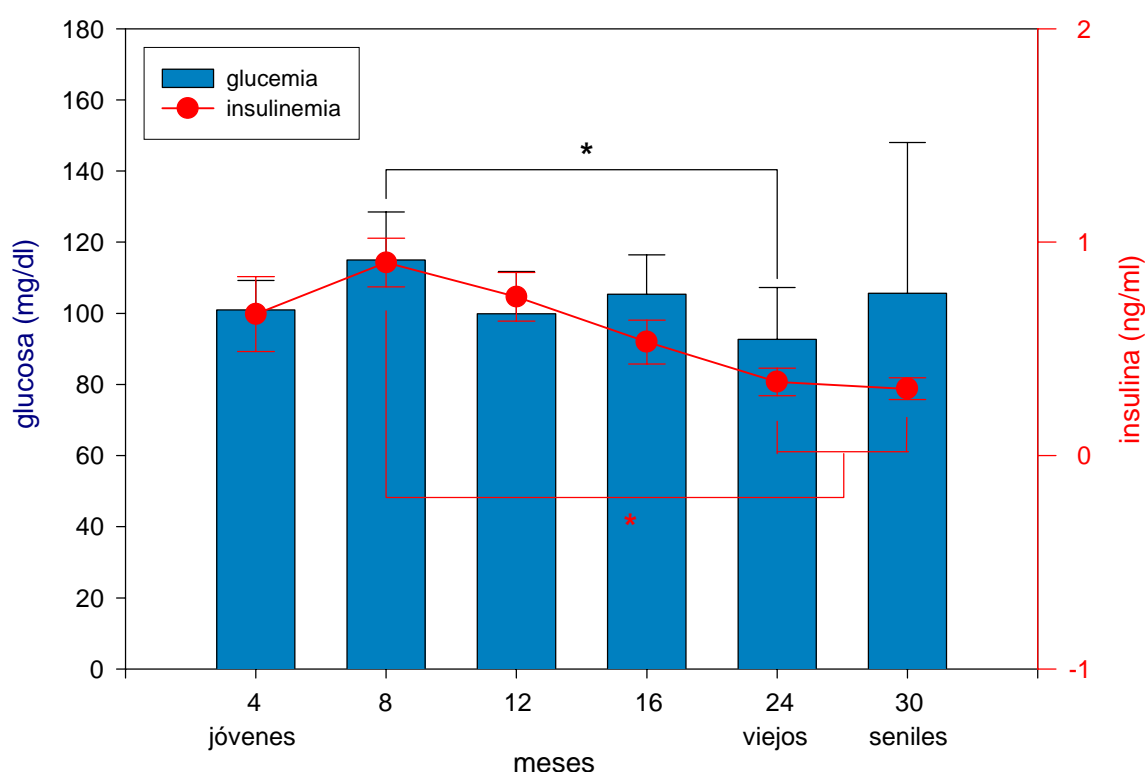


Figura 3.8. Niveles de glucosa e insulina plasmática en animales jóvenes, viejos y seniles. Los valores expresan la media \pm el ES. * = $p<0,05$; * = $p<0,03$

En cuanto a los niveles de insulina, la curva muestra valores similares en los animales 4, 8 y 12 meses de edad, luego de lo cual comienza a descender hasta llegar a valores significativamente ($p<0,03$) inferiores en los animales de edad avanzada (V y S). Esta disminución en los valores plasmáticos de los grupos V y S ($V = 0,34 \pm 0,07$ ng/ml; $S = 0,31 \pm 0,05$ ng/ml) sólo fue significativa cuando se compararon cada uno de los dos grupos con los animales de 8 meses de edad ($0,905 \pm 0,11$ ng/ml).

Niveles de colesterol y triglicéridos

Como puede observarse en la figura 3.9, los niveles plasmáticos de triglicéridos no evidenciaron cambios significativos con la edad, observándose sólo un leve incremento en los valores de los animales S (J, $n=8$, $39,35 \pm 4,21$ mg/dl; V, $n=17$, $40,16 \pm 2,16$ mg/dl; S, $n=6$, $46,86 \pm 4,19$ mg/dl).

En la misma figura se comparan los valores de colesterol entre las tres edades estudiadas (J, V y S), hallándose un aumento significativo ($p<0.02$)

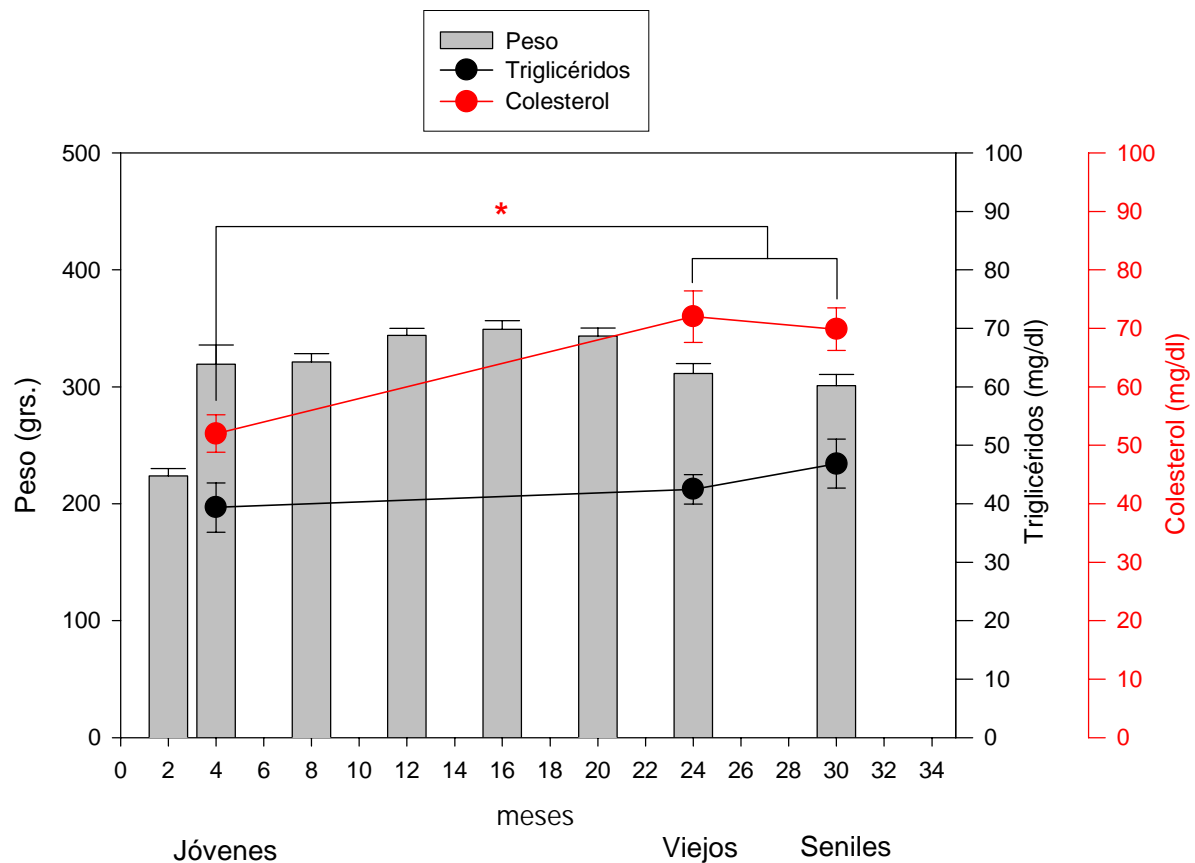


Figura 3.9. Niveles de triglicéridos y colesterol plasmáticos en relación con el peso de animales jóvenes, viejos y seniles. Los valores expresan la media \pm el ES; * = $p < 0.02$.

en los animales V y S respecto a los J (J = $52,02 \pm 3,19$ mg/dl; V = $72,06 \pm 4,40$ mg/dl; S = $69,83 \pm 3,65$ mg/dl), no habiéndose detectado diferencias significativas entre estos dos grupos.

Finalmente, las barras verticales representan la evolución de los pesos de los animales tomados a intervalos regulares de tiempo, donde se observa que dichos valores no mostraron cambios significativos con la edad, a partir de los 4 meses.

Niveles de TBARS

La figura 3.10 muestra los valores de TBARS en las tres edades consideradas. En los animales jóvenes el nivel promedio detectado fue de $6,11 \pm 0,87$ nmol/ml, mientras que en los animales envejecidos se observó un aumento significativo, tanto en las ratas viejas ($25,26 \pm 2,19$ nmol/ml) como en las seniles ($32,47 \pm 4,31$ nmol/ml), no siendo estadísticamente significativas las diferencias entre estos dos últimos grupos.

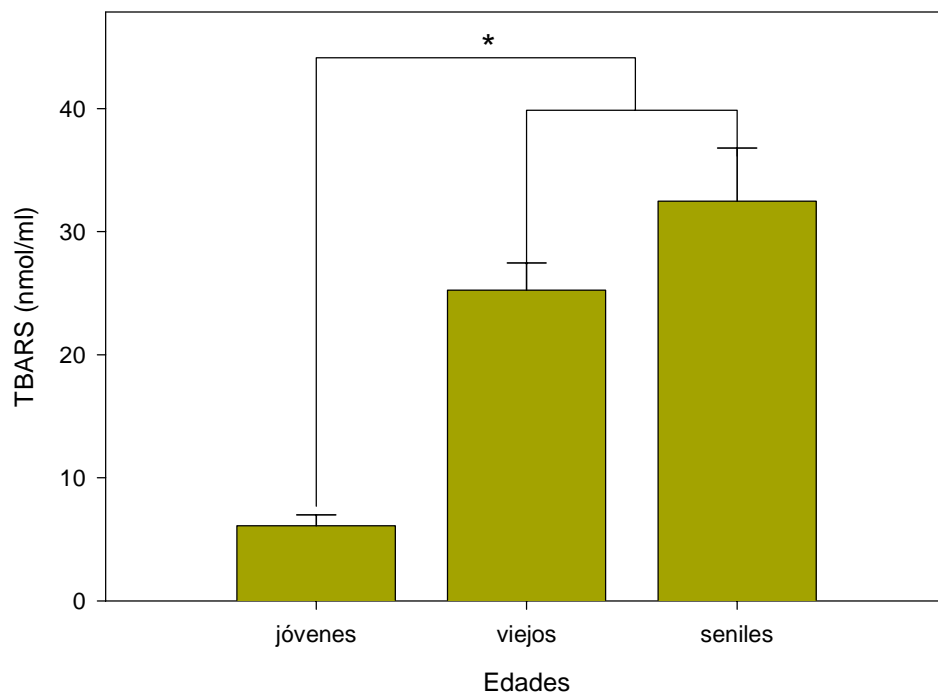


Figura 3.10. Niveles de TBARS en ratas jóvenes, viejas y seniles. Los valores expresan la media \pm el ES. * = $p < 0,002$

ENVEJECIMIENTO en Ratas diabéticas (eSMT)

Estudios morfológicos

Tanto las coloraciones histológicas de rutina (H-E y Tricrómico de Gomori), como la inmunohistoquímica, pusieron de manifiesto las profundas alteraciones en la histoarquitectura pancreática de esta cepa diabética. El análisis del material correspondiente a animales de 2 meses evidenció un aumento progresivo de fibrosis intersticial en el páncreas endocrino, manifestado a través de la aparición de tabiques conectivos intrainsulares (figura 3.12 B).

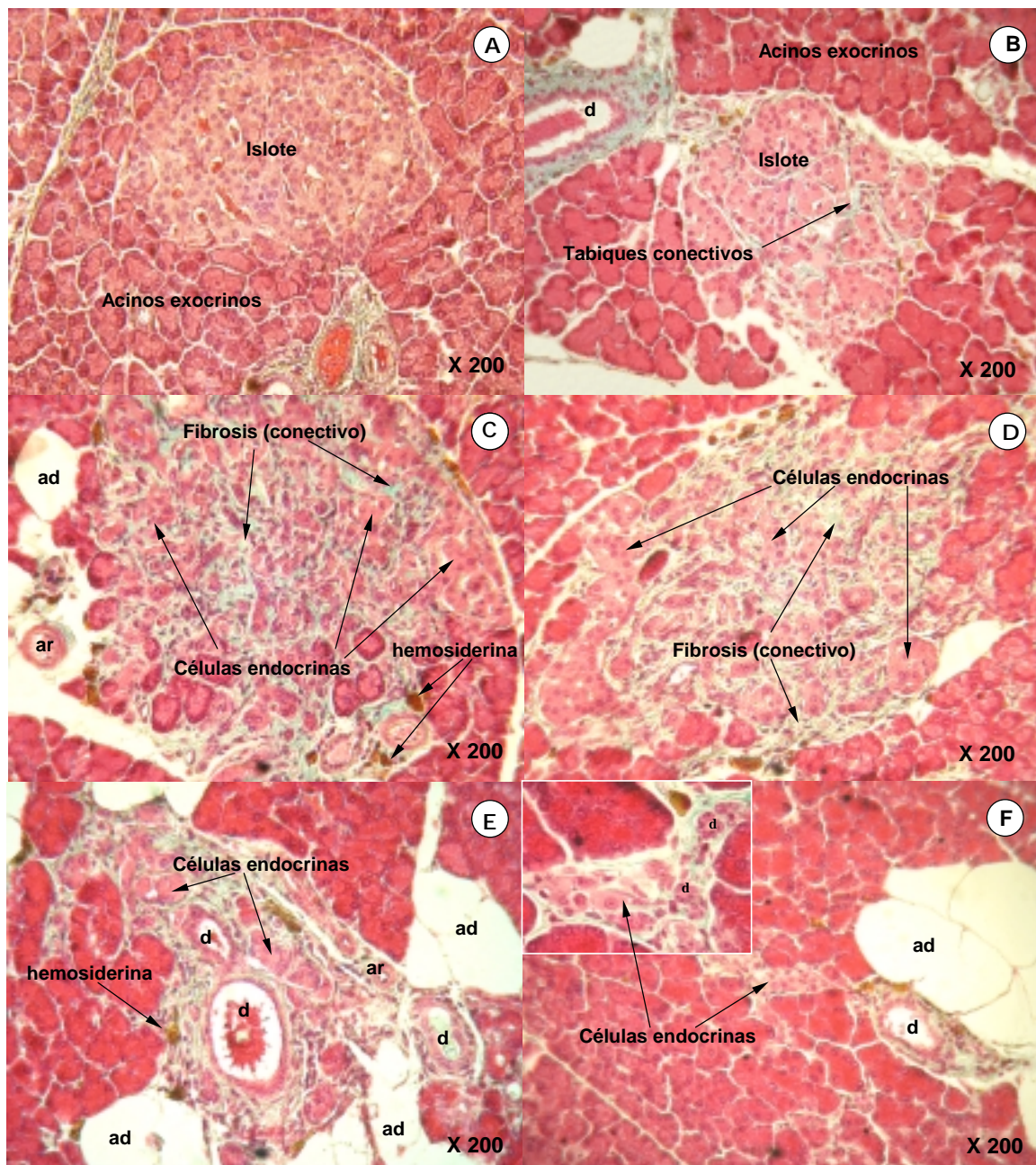


Figura 3.12. Cambios en la histoarquitectura pancreática en las diferentes edades estudiadas: (A) Control; (B) 2 meses; (C) 5 meses; (D) 10 meses; (E) 14 meses; (F) 18 meses. Tricrómico de Gomori (X 200). Referencias: ad: adipocitos; ar: arteriola; d: ducto

Como consecuencia de ello, ya a partir de los 5 meses (figura 3.12 C) se observó que los islotes se han transformado en estructuras fragmentarias y fibrosadas, compuestas por células o grupos de células endocrinas junto con focos de hiperplasia de células ductales, leucocitos y acúmulos pigmentarios no metabolizables (lipofucsina/hemosiderina). (figura 3.12. C, D, E). Es importante destacar que tanto los epitelios ductales como los vasculares, mostraron un engrosamiento significativo de sus membranas basales.

Sólo en los animales de 2 meses se detectaron figuras mitóticas aisladas en las células insulares (fig. 3.13 A, B).

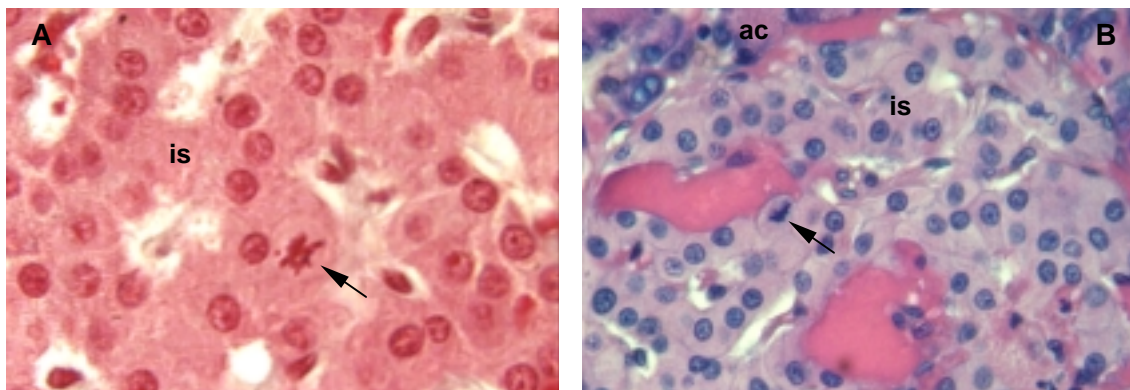


Figura 3.13 Mitosis de células insulares en animales de 2 meses. A. Tricrómico de Gomori, x800. B. HyE, x400. *Flechas:* mitosis; *is:* islote; *ac:* acino

Por otra parte, se observó un progresivo incremento del tejido adiposo intraglandular a través de las diferentes edades de esta cepa (fig. 3.12. B-F)

Análisis morfológico

La ausencia de islotes definidos en la mayor parte de los grupos estudiados, planteó la necesidad de analizar el tejido endocrino de forma diferente respecto a las ratas normales (SD). De esta manera, se omitió el conteo de islotes y la estimación del tamaño de los mismos, debido a la irregularidad de dichos parámetros.

La figura 3.14 muestra el resultado de estas mediciones, observándose una marcada disminución de la DV de la población endocrina durante el envejecimiento de esta cepa diabética. Es importante destacar el abrupto descenso del área endocrina durante los primeros meses de vida de los animales. A partir de los 5 meses ($DV = 0,0036 \pm 0,0007$, $n=5$), los valores descienden significativamente respecto al grupo de 2 meses ($DV = 0,0087 \pm 0,001$, $n=5$), haciéndose aun más evidente dicho descenso ($p<0,0001$) en los animales más envejecidos ($DV, 18 \text{ meses} = 0,0013 \pm 0,0003$, $n=5$).

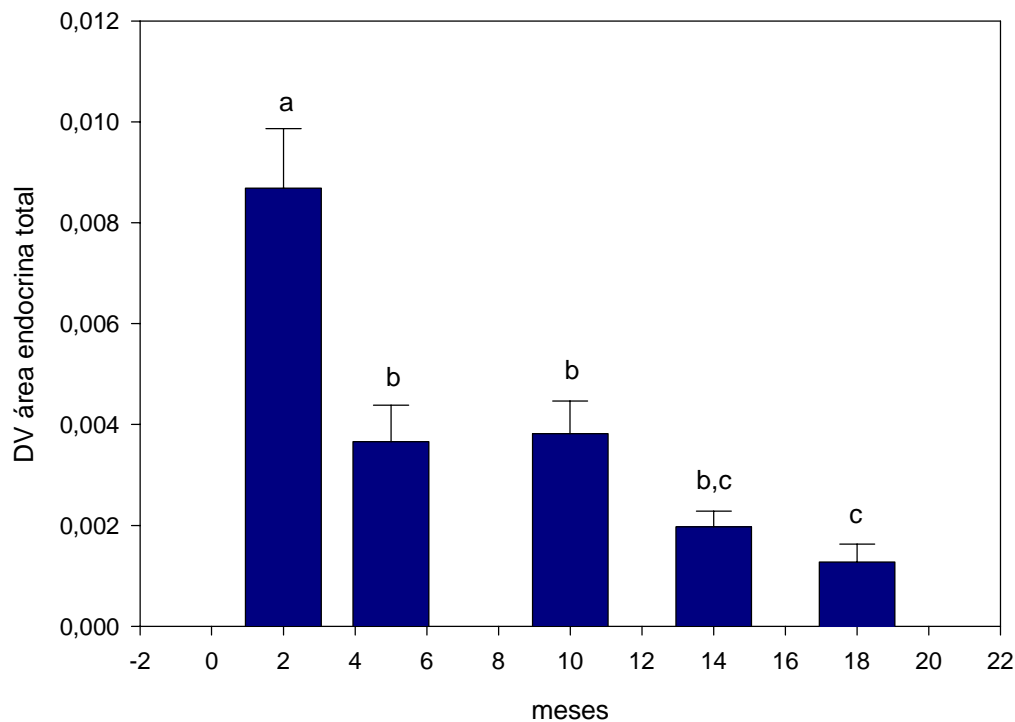


Figura 3.14. Densidad de volumen del tejido endocrino en las diferentes edades de las ratas eSMT. Los valores expresan la media \pm el ES. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,0001$); $n = 5$

Si bien en la figura 3.14. se puede observar que el descenso del área endocrina es evidente, el análisis cuantitativo de cada una de las poblaciones de células endocrinas, puso de manifiesto la incidencia relativa de cada una con relación al total del tejido insular (figura 3.15). De esta manera, se puede observar claramente el abrupto descenso de la DV de la población B durante los primeros meses de vida, como así también del resto de las poblaciones insulares.

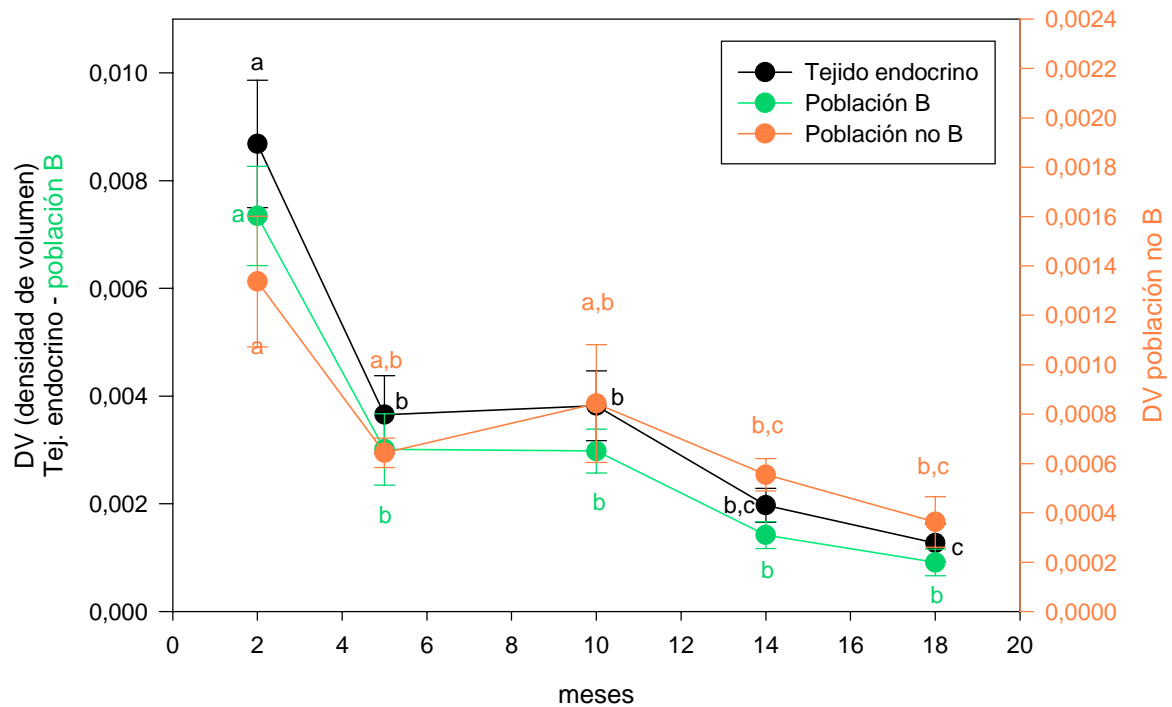


Figura 3.15. Comparación entre los valores de la DV del tejido endocrino, la población B y la no B en las diferentes edades de la cepa eSMT. Los valores expresan la media \pm el ES. Las distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

La figura 3.15. muestra comparativamente los perfiles de variación de las DV de la población B, la no B y del total del tejido endocrino. Cuando se analiza la DV de la población B y de la no B independientemente y a su vez, en relación a la DV de la población endocrina total, ambas descienden de forma casi paralela a lo largo del tiempo. Esto demuestra que el tejido endocrino desciende en forma conjunta, y no por la mayor o menor incidencia de alguna de las poblaciones insulares.

Replicación y diferenciación de las células endocrinas

Si bien la presencia de núcleos inmunorreactivos para PCNA en las células endocrinas de esta cepa de ratas fue superior respecto a los detectados en la cepa normal (SD), el conteo de los mismos arrojó una cantidad insuficiente para poder calcular un índice representativo de replicación celular. Cabe aclarar que la mayoría de los núcleos inmunomarcados se hallaron en células B de los individuos más jóvenes y en células ductales de los grupos de más edad, en los que también se identificaron células positivas para la insulina (fig. 3.16 B, C, D).

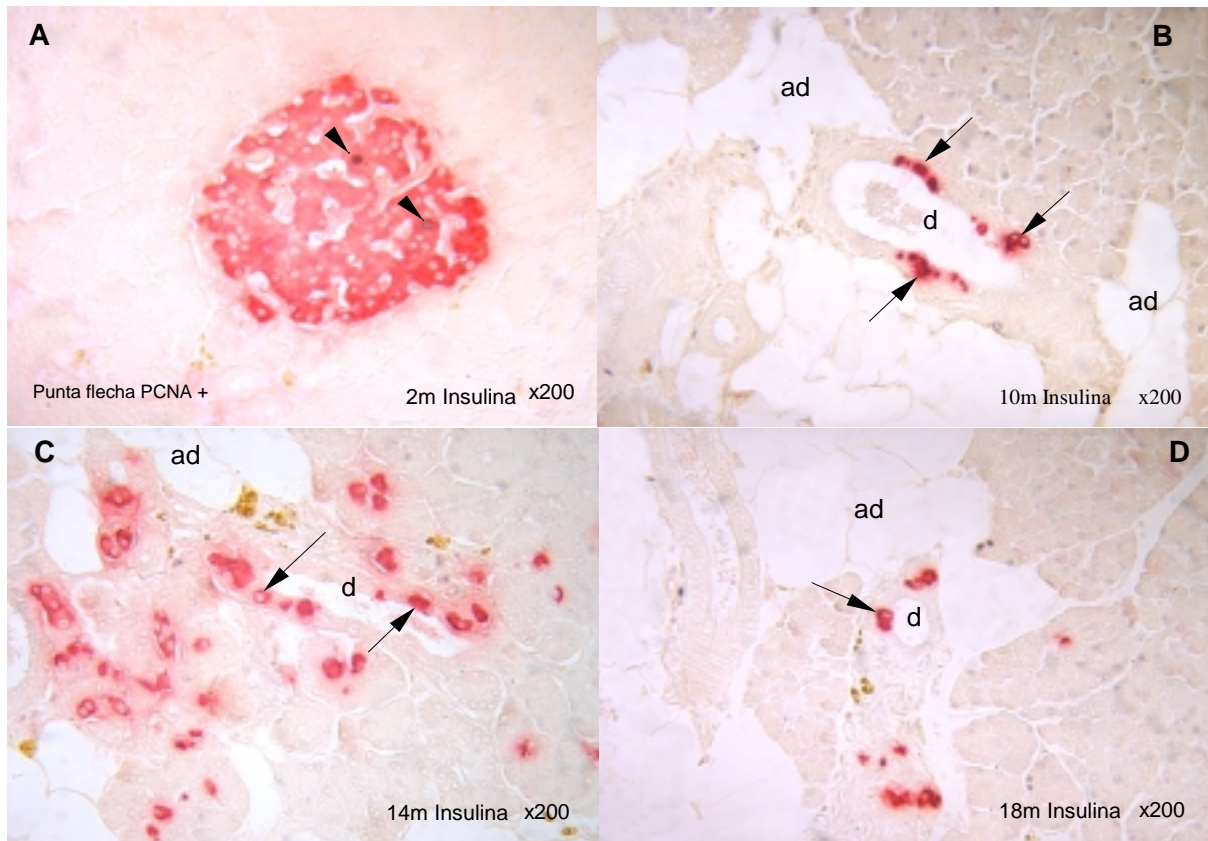


Figura 3.16. A, Animal de 2 meses. Islote inmunomarcado contra insulina. Flechas: núcleos PCNA (+). B, Animal de 10 meses. C, Animal de 14 meses. D, Animal de 18 meses. *flechas*: células ductales positivas para insulina; ad: adipocitos; d: ducto

Además se detectaron imágenes de diferenciación de células endocrinas a partir de células acinares y/o centroacinares en animales de 11 meses, fenómeno denominado por Bouwens (1998, 2000) como desdiferenciación ó transdiferenciación (fig. 3.17 A, B).

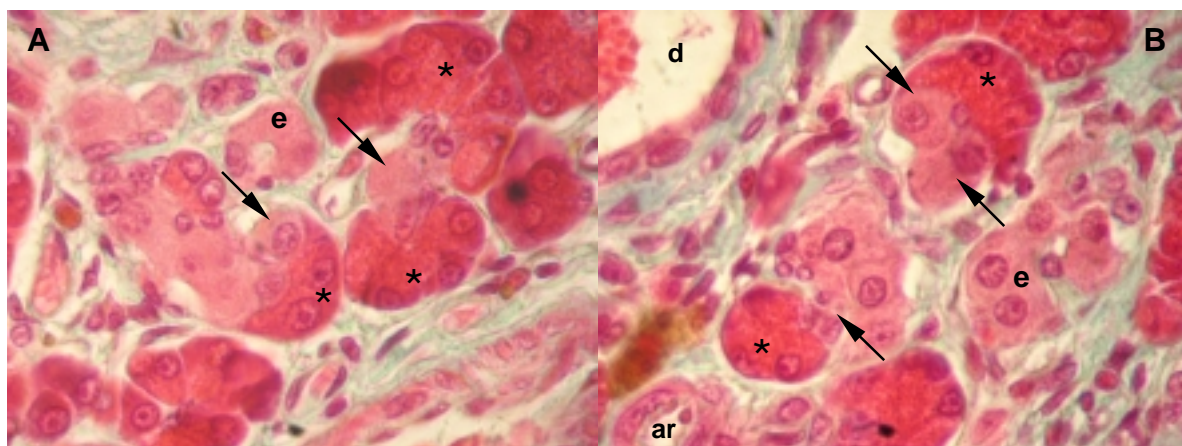


Figura 3.17 Imágenes de diferenciación de células endocrinas a partir de células acinares exocrinas en animales de 11 meses de edad. *asteriscos*: células acinares; *flechas*: células endocrinas asociadas a los acinos exocrinos; e: células endocrinas; d: ducto; ar: arteriola. Tricrómico de Gomori, x800

En cuanto al área celular de la población B, los resultados obtenidos (fig. 3.18) muestran un incremento significativo ($p < 0,05$) en sus valores promedio a partir de los 10 meses de edad ($DV = 114,21 \pm 6,70 \mu\text{m}^2$) respecto a los más jóvenes (2 meses = $98,6 \pm 3,01 \mu\text{m}^2$).

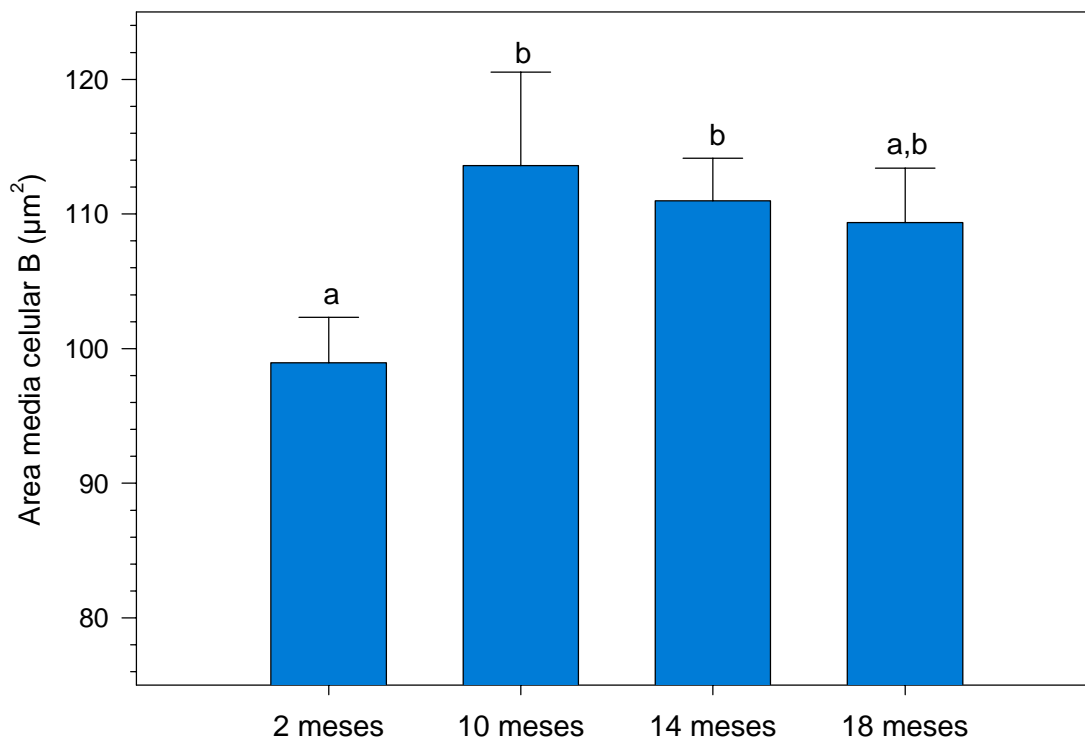


Figura 3.18. Área media celular B en ratas eSMT de 2, 10, 14 y 18 meses de edad. Los valores (expresados en escala logarítmica) expresan la media \pm el ES. Las letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Estudios plasmáticos

Niveles de glucosa e insulina

La figura 3.19 muestra las variaciones de glucosa e insulina plasmática durante el envejecimiento de las ratas eSMT.

Los niveles de glucemia mostraron un aumento significativo en las ratas de 14 y 18 meses (14m= $254,5 \pm 42,89$; 18m= $243,72 \pm 34,43$ mg/dl), más allá de evidenciar una clara tendencia a partir de los animales de 5 meses ($155,2 \pm 11,17$ mg/dl).

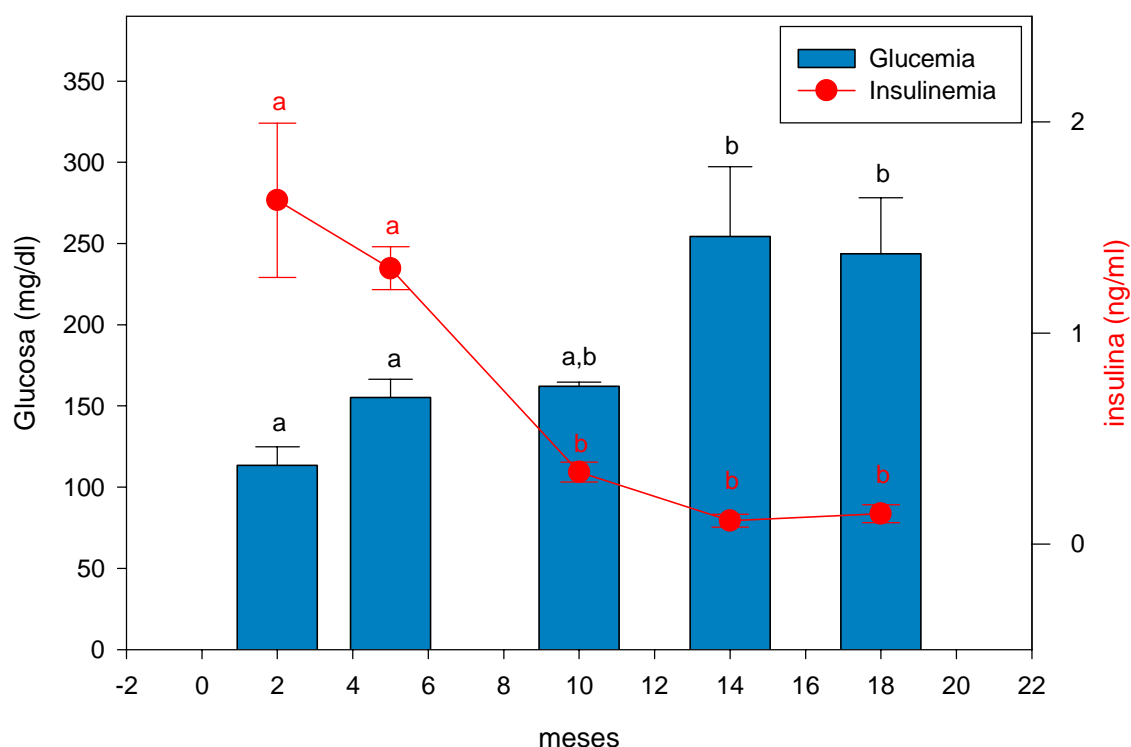


Figura 3.19. Niveles de glucosa e insulina en plasma de ratas macho diabéticas eSMT. Los valores expresan la media \pm el ES. Las letras diferentes indican diferencias significativas, $p < 0,0001$ (insulina); $p < 0,005$ (glucosa); $n = 5$.

Por otra parte, los valores de insulina evidenciaron un marcado descenso con la edad. Los animales de 2 y 5 meses mostraron valores similares no hallándose diferencias significativas entre ambos grupos ($2m = 1,63 \pm 0,365$ ng/ml; $5m = 1,30 \pm 0,101$ ng/ml). A partir de los 10 meses ($10m = 0,34 \pm 0,047$ ng/ml), los niveles de insulina descendieron significativamente ($p < 0,0001$) y se mantuvieron en ese rango hasta las edades más avanzadas ($14 = 0,11 \pm 0,03$ ng/ml y $18 = 0,14 \pm 0,04$ ng/ml meses).

	Insulina		Glucosa		DV _{pobB}	
	r	p	r	p	r	p
DV _{eTotal}	0.588	0.005	-0.605	0.004	0.992	0.0001
DV _{pobB}	0.623	0.003	-0.594	0.005	1	0

Tabla 2. Coeficientes de Correlación entre el páncreas endocrino y los valores de insulina y glucosa plasmáticas. DV_{eTotal}: densidad de volumen del tejido endocrino total; DV_{pobB}: densidad de volumen de la población B; r: coeficiente de correlación; p: nivel de significación del ANOVA.

La Tabla 2 muestra los coeficientes de correlación entre los valores de DV del tejido endocrino total y el DV de la población B, respecto a los valores de insulina y glucosa plasmáticos, como así también el coeficiente entre los dos perfiles de variación de ambos DV. Estos resultados demuestran la correlación entre el descenso del tejido endocrino y la pob. B con relación a la disminución de la insulina, y la correlación inversa (-) entre dichos parámetros y los valores de glucemia. Finalmente se puede destacar la elevada correlación entre el descenso del tejido endocrino total (DV_{eTotal}) y la porción correspondiente a la población B (DV_{pobB}).

Niveles de colesterol y triglicéridos

A diferencia de las ratas normales, la cepa eSMT mostró un incremento significativo ($p < 0,0001$) en los niveles de triglicéridos plasmáticos en los animales de mayor edad (14m = $160 \pm 16,25$ mg/dl; 18m = $205,8 \pm 27,47$ mg/dl), respecto a los grupos más jóvenes (2m = $75,2 \pm 8,99$ y 10m = $60,48 \pm 7,8$), no habiéndose detectado diferencias dentro de cada uno de los grupos referidos (figura 3.20).

En la misma figura se pueden apreciar los niveles de colesterol, los que mostraron, salvo en los animales de 18 meses, un perfil de variación semejante al

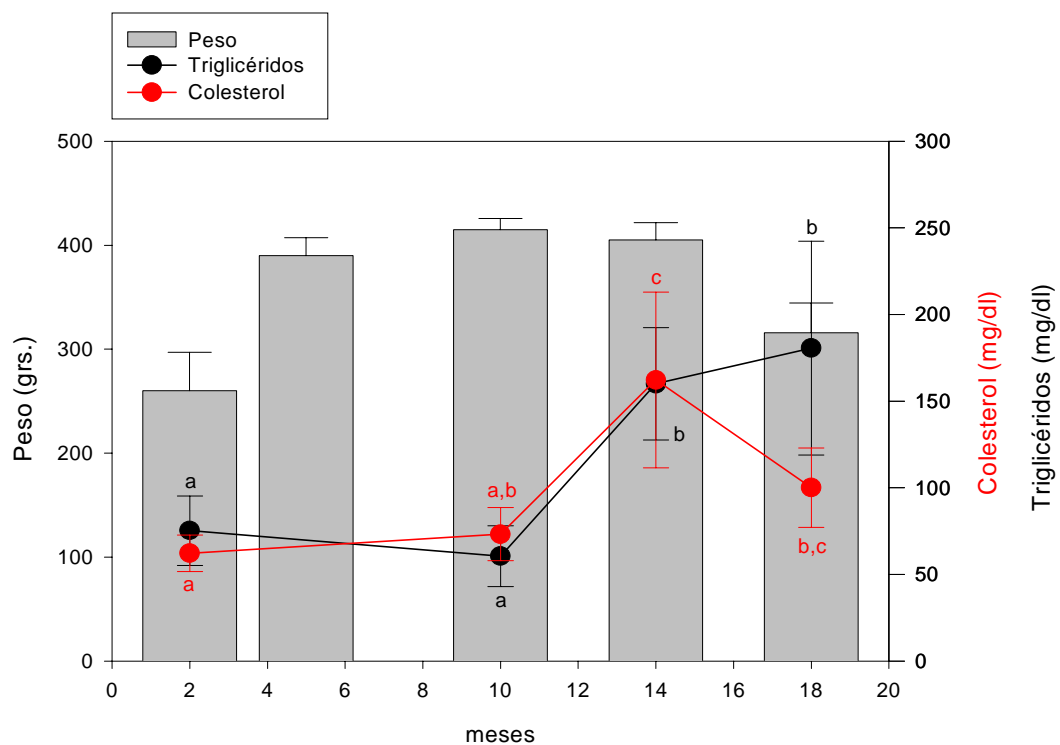


Figura 3.20. Niveles de triglicéridos y colesterol plasmático con relación al peso de ratas eSMT. Los valores expresan la media \pm el ES. Las letras distintas indican diferencias significativas $p < 0,0001$ (triglic.), $p < 0,0002$ (colest.); $n = 5$

de los triglicéridos. Los valores registrados en los animales de 2 y 10 meses fueron similares ($2m = 62,2 \pm 4,71$ mg/dl; $10m = 73,2 \pm 6,84$ mg/dl), incrementándose significativamente ($p < 0,002$) al alcanzar los 14 meses de edad ($162,25 \pm 23,34$ mg/dl).

Niveles de TBARS

Los niveles de TBARS evaluados en la cepa eSMT mostraron valores sensiblemente superiores en comparación con los obtenidos en las ratas normales SD.

En la figura 3.21 se pueden observar los niveles registrados en las diferentes edades, cuyos valores muestran una similitud entre los animales de 2, 10 y 14 meses ($2m = 32,61 \pm 4,15$ nmol/ml; $10m = 28,71 \pm 1,40$ nmol/ml; $14m = 37,85 \pm 2,40$ nmol/ml), siendo los individuos de 18 meses quienes registraron los mayores niveles plasmáticos de TBARS ($62,60 \pm 11,58$ nmol/ml). No obstante este incremento sólo fue significativo ($p < 0,03$) cuando se lo comparó con los animales de 10 meses.

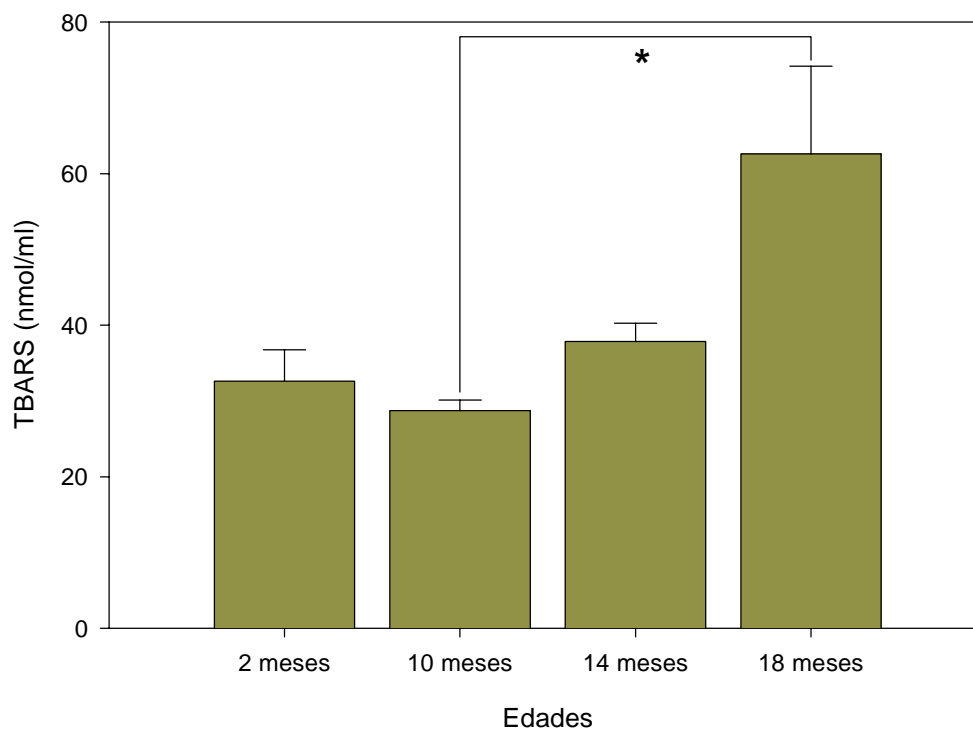


Figura 3.21. Niveles de TBARS en ratas eSMT. Los valores expresan la media \pm el ES; $n = 5$. * = $p < 0,05$

DISCUSIÓN

En la mayoría de los estudios sobre el envejecimiento del páncreas, los criterios de análisis utilizados han sido dispares. Muchos trabajos se refieren al envejecimiento analizando períodos parciales de la vida de los animales, que en algunos casos, contemplan rangos de edades de hasta 20 a 24 meses y sólo de forma excepcional superan dicho límite. A diferencia de ello, nuestro análisis abarcó todo el período postnatal hasta las edades terminales, que alcanzaron en promedio los 30 meses de edad, habiéndose analizado inclusive animales de hasta 36 meses.

De hecho, muchas de las alteraciones descritas no se manifestaron sino hasta las edades más avanzadas, lo que reafirma la importancia de este modelo para estudios posteriores. Asimismo, cabe destacar que a diferencia de la generalidad de los trabajos referidos al envejecimiento del páncreas, nuestro proyecto se basó en un estudio secuencial que incluyó la toma de muestras plasmáticas cada cuatro meses, permitiendo llevar un registro de la evolución de los principales parámetros analizados, tanto a nivel individual como del conjunto de cada una de las edades establecidas.

1. ENVEJECIMIENTO EN RATAS NORMALES (*S. Dawley*)

Teniendo en cuenta los diferentes aspectos que inciden sobre la homeostasis pancreática e intervienen en el desarrollo de los diferentes tipos de DM, el paso del tiempo ocupa sin dudas, un lugar de importancia dentro de ese conjunto de factores que alteran la fisiología del páncreas.

Sin embargo, resulta difícil analizar el efecto del envejecimiento, aislado de las patologías y los cambios degenerativos que se asocian con la edad avanzada (Timiras, 1995; Reaven *y col.*, 1979). No obstante, ha sido demostrado en ratas envejecidas una importante alteración en el sistema de regulación neuroendocrino, tanto a nivel del eje hipotálamo-hipofisario, como a nivel de las diferentes glándulas endocrinas (Meites *y col.*, 1987; Meites, 1992).

En cuanto a las alteraciones asociadas al páncreas endocrino, se ha descripto tanto en ratas (Draznin *y col.*, 1985; Elahi *y col.*, 1985) como en humanos (De Fronzo, 1984; Jackson, 1990), que el incremento de la edad está asociado principalmente a un descenso en la tolerancia a la glucosa, como así también a

una disminución en la secreción de insulina y/o a estados de insulino-resistencia (Cavaghan *y col.*, 2000; Fink *y col.*, 1983; Rowe *y col.*, 1983). Se ha propuesto además que uno de los mecanismos que podría estar implicado en estas disfunciones, estaría relacionado con una deficiencia funcional del tejido productor de insulina (Draznin *y col.*, 1985), posiblemente asociada a alteraciones estructurales producidas durante la edad avanzada (Hadju et al, 1967). Si bien estas alteraciones en los tejidos de la glándula estarían vinculadas a un déficit funcional de los mismos, resulta difícil establecer una relación directa ó causal entre ambos aspectos.

Nuestras observaciones, confirmaron la presencia de cambios en la histoarquitectura glandular, evidenciados en una distorsión progresiva del parénquima y del estroma pancreático (Riccillo *y col.*, 2004). Sin embargo, estas alteraciones no fueron detectadas de manera uniforme en cada uno de los grupos estudiados. Coincidiendo con observaciones previas, no todos los animales viejos y seniles, presentaron el mismo grado de distorsión en la histología pancreática (Dillberger, 1994; Hajdu y Rona, 1967; Reaven *y col.* 1981). Si bien la mayoría de los animales envejecidos mostraron cambios evidentes en el parénquima glandular, las alteraciones histopatológicas más severas fueron detectadas en el grupo de animales seniles (30 o más meses), confirmando de esta manera la importancia de lo planteado en párrafos anteriores.

El componente principal en la distorsión del tejido pancreático observado en nuestros animales, al igual que en los estudios realizados por Reaven *y col.*(1981), Hajdu y Rona (1967) y Dillberger (1994), fue el aumento de la fibrosis intersticial. Este progresivo incremento del tejido conectivo, se vio reflejado en las diferentes estructuras, tanto a nivel vascular (arterioesclerosis), ductal (ectasia y/o hiperplasia adenomatosa y quística), como acinar e insular (fragmentación y polimorfismo). Es necesario destacar que, si bien Reaven *y col.* (1981) realizaron estos hallazgos en ratas SD de sólo 12 meses de edad, los pesos promedio de estos animales fueron extraordinariamente elevados (alrededor de 800 gs.) considerando que es una cepa normal. Sin embargo cuando sometieron a un grupo de animales a restricción calórica ó ejercicio, lograron revertir en gran parte los cambios observados en el grupo alimentado *ad libitum*. Esto indicaría que dichas alteraciones estarían asociadas a problemas de dieta y/o sedentarismo de los animales, más que al efecto del envejecimiento, teniendo en cuenta que sólo se analizó esta condición hasta los 12 meses de edad. Dillberger (1994) en cambio,

estudió la misma cepa hasta los 26 meses, observando que en los animales que alcanzaban dicha edad ya no se detectaban islotes de gran tamaño, sino mas bien pequeños grupos de células insulares, separadas por tejido conectivo y acinos exocrinos interpuestos. Estas últimas observaciones coinciden con la morfología descrita en nuestros estudios de animales seniles de 30 meses, más allá de que las primeras imágenes de disrupción insular, aparecieron en algunos animales viejos (24 meses).

Esta distribución del tejido insular, sería consecuencia, al menos en parte, de una fragmentación de los islotes preexistentes ocasionada por el avance progresivo del tejido conectivo intersticial. Esta suposición está avalada por la escasa presencia de células B positivas para PCNA (indicador de proliferación celular) y de imágenes de neogénesis insular (presencia de nidos celulares endocrinos asociados a los ductos) observadas. Igualmente, es importante destacar que aunque en pequeña proporción, la presencia de células ductales PCNA positivas y la de células aisladas asociadas a los mismos, sugiere la existencia de un mecanismo de neogénesis compensador.

De acuerdo a nuestros análisis morfométricos, la población B aparece como el grupo de células endocrinas más afectadas por el envejecimiento. Esto se refleja en el aumento significativo de la DV en los animales seniles de los dos grupos de ratas SD estudiados. Estos resultados demuestran un comportamiento diferente de la población B a través de la edad, respecto al resto de las poblaciones insulares, en las que (en el primero de los grupos analizados) no se detectaron cambios significativos en la DV (Riccillo *y col.* 2004). Similares observaciones fueron descritas en los trabajos de DeClercq *y col.* (1988) y McEvoy (1981). Sin embargo, en el otro grupo analizado, se observó un descenso significativo en la DV de la población D de los animales viejos y seniles respecto a los jóvenes. Si bien, en términos generales, las poblaciones no B no sufren variaciones en la edad adulta de ratas normales, algunos autores coinciden en que, eventualmente, pueden experimentar un descenso absoluto y/o relativo (relación B : no B) con la edad, aspecto que estaría asociado con la interacción paracrina entre las diferentes poblaciones insulares en relación con la regulación de la tolerancia a la glucosa en los individuos de edad avanzada (Slavin *y col.* 1990).

Por otra parte, los trabajos de DeClercq *y col.* (1988) en ratas Wistar, describieron que tanto la DV de la población endocrina total, como el número de islotes se incrementan de forma significativa entre los 6 y los 24 meses,

disminuyendo hacia valores similares a los animales de 6 meses en la siguiente edad analizada (30 meses). Sin embargo, estos autores no encontraron cambios aparentes en el aspecto, ni en la distribución de las distintas poblaciones insulares, destacando el incremento de figuras nucleares picnóticas a partir de los 24 meses de edad, hecho que explicaría el descenso de la masa celular endocrina descrito previamente. Finalmente, estos autores, cuestionaron las observaciones de Reaven y col. (1979,1981), sugiriendo que las alteraciones metabólicas no serían atribuibles a una deficiencia estructural del tejido secretor de insulina, aunque admitieron esa posibilidad en edades muy avanzadas, en donde es frecuente observar una intolerancia a la glucosa.

Si bien la información obtenida por Hajdu y Rona (1967) y Dillberger (1994) es coincidente respecto a los cambios descritos a nivel de los islotes, surgen diferencias en relación con las explicaciones que estos autores atribuyen al proceso. Hajdu y Rona (1967) en coincidencia con los trabajos de Reaven y col.(1979, 1981), sugieren que la capacidad de la célula B para secretar insulina declina con la edad. Si además, con el tiempo los animales aumentan excesivamente de peso y/o desarrollan insulino-resistencia, la demanda de insulina sobre el páncreas aumentaría. Esta demanda, asociada a la disminución de la capacidad secretora de la población B durante el envejecimiento, provocaría una sobrecarga en la función de las mismas y eventualmente la muerte de algunas de ellas. En respuesta a ello, se formarían nuevas células, incrementando el volumen insular y otorgándole el aspecto multilobulado observado en los islotes de animales viejos. Según Reaven y col., la dieta y el ejercicio disminuirían el requerimiento de insulina, normalizando en parte la situación descrita. El desarrollo de un estado de insulino-resistencia en ratas de vida sedentaria alimentadas *ad libitum*, sería uno de los principales factores responsables de las alteraciones observadas a nivel insular. Dillberger (1994), en cambio, deja abierto el análisis sobre la etiopatogenia de dichas alteraciones.

Numerosa evidencia experimental obtenida en roedores (Bonner-Weir y col., 1989; Finegood y col., 1995; Pick y col., 1998^a; Steil y col., 2001;) y, en menor medida, en humanos (Klöppel y col. 1985; Maedler y col., 2004; Weir y col., 2004), ha demostrado que existe un enorme esfuerzo compensador de las células B, para mantener niveles de glucemia normales, frente a estados de obesidad y/o insulino-resistencia. En general, se pueden resumir en dos los tipos de respuesta

compensadora: una funcional, en la que cada célula B intenta secretar más insulina, y una segunda respuesta en la que existe un incremento de la masa celular B. Sin embargo, parece ser la plasticidad de la masa celular B el principal factor responsable de la respuesta secretora de insulina (Bonner-Weir, 2000). A su vez, la evidencia de que la población B existe en un estado dinámico, es cada vez más sólida. Esto significa que el número de células B estaría determinado por el balance entre la renovación celular, ya sea por replicación de células preexistentes o por diferenciación a partir de células ductales, y la muerte de dichas células (Bernard-Kargar *y col.*, 1999; Bernard-Kargar *y col.*, 2001; Bonner-Weir, 2000; Bonner-Weir, 2001; Dor *y col.*, 2004; Finegood *y col.*, 1995; Georgia *y col.*, 2004; Swenne, 1983). Además, no sólo la variación del número de células regula la masa celular B, sino que también los cambios en el tamaño celular (hipotrofia/hipertrofia) contribuyen a dichas variaciones. La hipertrofia, representaría un mecanismo eficiente y económico como respuesta compensadora inmediata, aunque casi siempre esta estrategia es insuficiente y se continúa con un incremento en la multiplicación celular. Estas evidencias han sido reconocidas en varios modelos murinos (Bonner-Weir *y col.*, 1989; Jonas *y col.*, 1999; Xu *y col.*, 1999).

En relación con ello, cabe destacar que tanto en nuestros estudios como en los trabajos de Reaven *y col.* (1981); Hajdu y Rona (1967) y Dillberger (1994), no se detectaron cambios significativos en el tamaño de la célula B. En consecuencia, se podría estimar que las variaciones observadas en el volumen insular, estarían asociadas principalmente a cambios en el número, más que en el tamaño de las células secretoras de insulina. En este sentido, la detección de células PCNA positivas en algunas células ductales y la presencia de nidos de células A y B asociadas a los ductos, podrían estar justificando en parte dicho mecanismo, es decir una inercia proliferativa neogénica en respuesta a la edad. A su vez, la ausencia de núcleos positivos para PCNA en células B, sugeriría que el incremento observado en la población B, no se produciría, a partir de la replicación de células beta preexistentes. Sin embargo, es imposible afirmar que el aumento en el tamaño celular (hipertrofia), y la replicación de células B diferenciadas, hayan estado completamente ausentes de la respuesta compensadora durante la vida adulta, ya que la brevedad de la manifestación de ambos eventos, hace poco probable su detección, teniendo en cuenta que los momentos de sacrificio representan sólo instantes en cada una de las edades estudiadas. Además, es

importante destacar que la hipertrofia, como respuesta, ha sido descrita principalmente en modelos inducidos representando una respuesta aguda a diferentes estímulos específicos, como la administración de glucosa, pancreatectomía, etc., (Bonner-Weir *y col.*, 1989; Jonas *y col.*, 1999; Xu *y col.*, 1999), lo cual hace aun más razonable pensar en la idea de que la respuesta hipertrófica, si existió, no ha sido relevante en las células B de nuestras ratas SD envejecidas. Además, como ya ha sido descrito, el hecho de que la capacidad secretora de la célula B disminuya con la edad, sea o no como consecuencia de un estado de insulino-resistencia, reforzaría la idea de un aumento de la masa celular B para equilibrar la menor capacidad secretora de cada una de ellas (Bonner-Weir, 2000).

Por otra parte, existe evidencia de una heterogeneidad funcional a nivel de la población B (Pipeleers, 1992; Ruhe *y col.*, 1997), es decir, una diferente sensibilidad para la glucosa entre dichas células, que sería de vital importancia en la adaptación a las variaciones en la secreción de insulina durante el envejecimiento y/o estados de sobrecarga metabólica, agregando una variable más a la hora de analizar la complejidad de la respuesta compensadora de la masa endocrina.

Finalmente, y más allá de las numerosas evidencias en uno y otro sentido, resta aun dilucidar, si este aumento compensador proviene de una o más poblaciones no B (ductales, acinares u otro tipo endocrino), de células B diferenciadas, o de ambos tipos; y en este último caso qué proporción de cada una de ellas participaría en la renovación y/o reposición de las células secretoras de insulina.

Si bien los niveles glucémicos obtenidos en nuestras ratas SD, se mantuvieron dentro de los rangos normales durante todas las edades, algunos animales seniles arrojaron valores más elevados que, a pesar de no mostrar diferencias significativas, confirman la tendencia hacia una intolerancia a la glucosa con la edad referida por otros autores (Coordt *y col.*, 1995; De Fronzo, 1984).

En cuanto a la insulina plasmática, en coincidencia con los trabajos de Reaven *y col.* (1979, 1981, 1983), los valores promedio aumentaron hacia los 8 meses de edad, disminuyendo luego hacia las edades terminales. Si bien los animales viejos y seniles mostraron diferencias significativas sólo respecto a los de 8 meses, no se hallaron diferencias respecto al grupo de animales más jóvenes (4 meses). Un perfil similar en la evolución de los cambios en la insulina plasmática, fue descrito

más recientemente por Koricanac *y col.* (2004), quienes observaron un aumento significativo entre los 6 y 16 meses, descendiendo a valores normales en los animales más viejos (21 meses).

Si además de considerar que la insulina plasmática disminuyó con la edad, tenemos en cuenta que en el páncreas de nuestras ratas seniles hubo un aumento de la población B, podemos suponer que la capacidad secretora de dichas células disminuyó en los animales más envejecidos. Esta suposición coincide con la creencia actual del comportamiento de la población B, según la cual, esta población respondería sobre la base de la variabilidad celular y heterogeneidad funcional, compensando mediante hiperplasia y/o hipertrofia y estableciendo un equilibrio dinámico en la respuesta de la población endocrina. Sin embargo, en caso de que la población B sufriera un marcado descenso en su masa celular, difícilmente el aumento de la capacidad secretora por sí sólo podría revertir dicha situación.

En humanos, los estudios del efecto del envejecimiento sobre la secreción de insulina, sugieren un comportamiento similar. Es decir, un defecto en la secreción de dicha hormona, que estaría relacionado con un aumento de la resistencia a la insulina, asociado posiblemente con un descenso en los niveles de remoción de la misma (Chang *y col.*, 2002; De Fronzo, 1984; Moller *y col.*, 2003).

Existen no obstante muchas controversias sobre los mecanismos específicos que subyacen al comportamiento y a la respuesta de la población B durante el envejecimiento y, sobre todo, el grado de influencia del paso del tiempo en la predisposición hacia un estado diabético.

En cuanto a los lípidos plasmáticos, ha sido descripto que en estados de insulino-resistencia, tales como la DM tipo 2 y la obesidad, tanto los ácidos grasos libres (AGL) como los niveles de triglicéridos (TG) y colesterol (CL) muestran generalmente niveles plasmáticos elevados (Boyko *y col.*, 2000; Hardy *y col.*, 2002; Unger *y col.*, 1999). En el envejecimiento los datos son más variables, sobre todo en relación con las diferentes cepas murinas y los estados de actividad y/o alimentación de los roedores (Das *y col.*, 2004; Hardy *y col.*, 2002; Hubert *y col.*, 2000; Molon-Noblot *y col.*, 2001; Story *y col.*, 1981).

Nuestros resultados respecto de los niveles de TG en las ratas SD no muestran variaciones significativas con la edad excepto que, como podía esperarse, algunos individuos seniles mostraron valores de TG plasmáticos más altos que el promedio.

Los niveles elevados de TG y ácidos grasos libres en el plasma, y sobre todo su acumulación intracelular, son una de las principales causas del desarrollo de importantes patologías como la obesidad, la DM y las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, poco es lo que se sabe respecto a una posible relación causal entre los niveles de TG y el envejecimiento, y los probables mecanismos implicados, más allá de la evidente influencia que su acumulación, tanto en el plasma como en los tejidos, ocasiona en la salud de un organismo.

Respecto al CL plasmático, el aumento detectado en los animales viejos y seniles coincide con lo descrito en gran parte de la bibliografía (Dillberger, 1994; Hubert *y col.*, 2000; Reaven *y col.*, 1981, 1983). Resta aun dilucidar, al igual que con los TG, si existe alguna asociación causal entre los niveles de CL y la progresión del proceso de envejecimiento.

Más allá de que aun se discute cuáles serían los mecanismos específicos involucrados (Koubova *y col.*, 2003), ha sido demostrado no sólo en roedores, sino también en diferentes especies animales (peces, insectos, gusanos) y en levaduras, que la restricción calórica (RC) prolonga la expectativa de vida de los individuos (Barzilai *y col.*, 1999; Heilbronn *y col.*, 2003; Jazwinski *y col.*, 2000; Koubova *y col.*, 2003; Sohal *y col.*, 1996). La RC disminuiría la tasa metabólica y reduciría el metabolismo oxidativo celular, no sólo a nivel de los lípidos, sino también de las proteínas y del ADN.

Una de las teorías con más fuerza en la actualidad sostiene que el envejecimiento sería producto de la acumulación del daño oxidativo sobre los lípidos, las proteínas y el ADN celular, a través de la acción de moléculas oxígeno reactivas (ROS) producidas durante la respiración celular (Beckman *y col.*, 1998; Harman, 1981; Sohal *y col.*, 1996). Puntualmente, el envejecimiento sería consecuencia de un desbalance entre procesos pro-oxidativos y anti-oxidativos, en dirección a un estado pro-oxidativo. Por otra parte, existen evidencias de que la sobre expresión del sistema de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx), reducen los niveles de ROS mitocondriales y extienden la edad promedio de los organismos. Sin embargo, en animales sujetos a RC, no habría variaciones importantes en los niveles de dichas enzimas, por lo que se cree que el efecto de la misma es ejercido independientemente del sistema antioxidante (Gredilla *y col.*, 2005).

Tradicionalmente, se ha considerado que los lípidos son las moléculas que mayor agresión oxidativa sufren, por lo que la teoría de envejecimiento basada en

el daño oxidativo, ha sido denominada por algunos como teoría de envejecimiento de la peroxidación lipídica. En nuestras ratas normales (SD), la clara correlación hallada a nivel plasmático entre los niveles de TBARS (moléculas reactivas al ácido tiobarbitúrico) y las edades de los animales, confirma la suposición de encontrar niveles de peroxidación lipídica elevados en las ratas de mayor edad.

Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos en trabajos realizados sobre peroxidación de lípidos y envejecimiento, sobre todo en modelos *in vivo* (Rikans, 1997), han mostrado tendencias contradictorias, nuestros datos aportan una valiosa evidencia al respecto, reforzando la idea del impacto del metabolismo oxidativo asociado a la edad avanzada y la consecuente correlación que existe entre ambos parámetros.

Sumado a ello, el progresivo aumento de los pigmentos del tipo lipofucsina/hemosiderina, detectados en el tejido pancreático, confirman la manifestación de la acción oxidativa, tanto sobre los lípidos como sobre las proteínas e hidratos de carbono. Esta es la razón por la cual comúnmente también se los denomina pigmentos del envejecimiento.

Más allá de lo expuesto, aun continúan las discrepancias respecto al grado de incidencia de uno u otro factor en la evolución pancreática durante el envejecimiento. Sin embargo, está claro que la población B sufre a lo largo del tiempo alteraciones en su metabolismo y masa celular.

Aparentemente, estos cambios serían consecuencia de una respuesta compensadora frente a un estado de insulino-resistencia, de frecuente manifestación en la edad avanzada, ya sea producida por una disminución de los receptores insulínicos en los tejidos blanco, por una alteración de los mismos ó por algún desacople en la respuesta post-receptor en dichos tejidos. Esta situación implicaría una mayor necesidad de producción y liberación de insulina por parte de la población B, compensación que de hecho normalmente sucede en los organismos normales, caso contrario estaríamos frente al período inicial de un estado diabético tipo 2.

2. ENVEJECIMIENTO EN RATAS DIABÉTICAS (eSMT)

El origen de la diabetes y su etiopatogenia ha sido eje de muchos análisis y discusiones y aun continua siendo foco de controversias y numerosas investigaciones.

Como señalamos anteriormente, el envejecimiento está asociado a un descenso en la tolerancia a la glucosa, como así también a una disminución en la secreción de insulina y/o a estados de resistencia a dicha hormona.

Se sabe también que la insulino-resistencia (IR) es una condición necesaria para el desarrollo de la DM tipo 2, aunque no necesariamente todos los individuos que manifiesten IR desarrollarán DM.

Más allá de los diversos factores involucrados en el desarrollo de la DM, la inadecuada función de la célula beta representa un componente esencial en casi todas las formas de la enfermedad (Weir *y col.*, 2001). Por ello, más recientemente, muchos estudios se han focalizado sobre los factores responsables de la disfunción y el deterioro de la célula B en relación con el estado de IR (Kahn, 2003). En este sentido, muchos han sugerido que el estado insulino-resistente antecede a la disfunción de la célula B, la que surgiría como consecuencia de la prolongada y elevada demanda secretoria que dicho estado de resistencia ejercería sobre la propia población B (Cavaghan *y col.*, 1999; DeFronzo, 1997; Olefsky, 2000; Reaven, 1988). Por otra parte, otros autores opinan que la disfunción de la célula B, manifestada principalmente a través del descenso en la secreción de insulina, es un prerrequisito para el avance hacia la hiperglucemia (Chiasson, 2004; Gerich, 2002; Kahn, 2001; Leahy, 1996). Según Kahn (2003), este aparente desacuerdo sobre la importancia relativa de la IR respecto a la disfunción de la célula B, se debe en parte a que generalmente ambos aspectos se evalúan en forma aislada y no como el sistema de auto-regulación que representa. De acuerdo a ello, según Kahn (2003) parece más probable que la alteración de ambas condiciones sea una característica presente en una etapa temprana del desarrollo de la DM tipo 2.

La evidencia demuestra que estarían involucrados tanto factores genéticos como metabólicos.

En efecto, el principal cambio observado a lo largo de las diferentes edades en el páncreas de nuestras ratas diabéticas (eSMT), fue la disminución en el número de las células secretoras de insulina, asociada con un avance progresivo de la fibrosis

intraisular a través de la acumulación y el depósito de matriz extracelular (ME). Este hallazgo, estuvo acompañado por la presencia de adiposidad intraglandular, depósito de acúmulos de pigmentos no metabolizables en el intersticio (hemosiderina) y la presencia de células ductales; estas últimas agrupadas frecuentemente en focos hiperplásicos interpuestos con la población insular y el componente fibroso. Si bien es difícil establecer una asociación directa entre los diferentes aspectos descriptos, existen evidencias de hallazgos similares en otros modelos murinos tanto obesos como no obesos asociados con la DM tipo 2, especialmente en relación con la variación de la masa celular B y la presencia de fibrosis intersticial. En la cepa progenitora eSS han sido descriptos cambios morfológicos similares, aunque dichos cambios fueron menos severos y se detectaron de forma evidente recién en las edades más avanzadas (14 -18m) en comparación con el temprano desarreglo observado en la cepa eSMT. No obstante, la presencia de fibrosis asociada a la disrupción insular fue una de las principales alteraciones observadas en la línea progenitora (Gómez Dumm *y col.*, 1989; Martínez *y col.* 1993; Martínez *y col.*, 1994). Además, en la rata no obesa Goto Kakizaki (GK) se ha descripto la presencia de grandes islotes irregulares debido a la invasión de tejido conectivo interpuesto entre las células endocrinas (Koyama *y col.*, 1998; Movassat *y col.*, 1997). Por otra parte, mientras que en la rata Zucker obesa no diabética (ZF) se observaron ocasionalmente islotes irregulares y fibróticos en animales de 3 meses, estas estructuras fibrosadas fueron mucho más frecuentes en ratas Zucker diabéticas obesas (ZDF) más jóvenes (1,5 a 2,5 meses) (Janssen *y col.*, 2001; Pick *y col.*, 1998). La cepa Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) también mostró islotes de aspecto similar a las anteriores, observándose además anormalidades en su irrigación (Hong E-G *y col.*, 2002; Ko *y col.*, 2004). Una línea establecida más recientemente, la rata Torii (SDT), que desarrolla una diabetes espontánea sin obesidad, presentando hiperglucemia a partir de los 5 meses de edad, muestra entre los 2 y 3 meses las primeras alteraciones a nivel de la vasculatura insular, hecho seguido por un proceso de inflamación y presencia de fibrosis (Masuyama *y col.*, 2004).

Resulta de interés analizar que las conclusiones propuestas por los distintos autores sugieren diferentes mecanismos para explicar las posibles causas en la variación de la masa celular B en cada uno de los modelos referidos. Mientras que en la rata ZDF, la falla en la respuesta compensadora de la población B se produciría a partir de un incremento en la tasa apoptótica de las células secretoras

de insulina (Pick *y col.*, 1998), en la rata OLETF, la descompensación estaría asociada a un defecto en la proliferación de dichas células (Zhu *y col.*, 1996; Hong E-G *y col.*, 2002). En cuanto a la rata GK, el déficit de la masa B observado en el adulto, estaría asociado con un defecto en el desarrollo de la población secretora de insulina, siendo en este caso una causa primaria más que una consecuencia del proceso diabético (Koyama *y col.*, 1998; Movassat *y col.*, 1997; Plachot *y col.*, 2001).

Respecto de la rata eSS, si bien ha sido descrito un aumento compensador en la DV de la población B hacia los 6 meses de edad, y un posterior descenso significativo en dicho parámetro en los animales de 18 meses, los autores no profundizaron en sus probables causas más allá de considerar la posible existencia de un proceso apoptótico asociado. (Gómez Dumm *y col.*, 1989; 1990; Martinez *y col.*, 1993)

En cuanto a nuestra línea diabética, si bien las alteraciones son evidentes, resta dilucidar el o los mecanismo/s involucrado/s en el abrupto descenso de la población insular, dado que los datos de replicación y muerte por apoptosis obtenidos, no proveen una base suficiente para abordar una conclusión definitiva al respecto. Sin embargo, la presencia de figuras mitóticas en el islote durante los primeros meses (2 a 5 meses de edad), la posterior aparición de células ductales marcadas con insulina y la presencia de pequeños grupos de células insulares asociadas a los ductos, principalmente a partir de los 10 meses de edad, sugieren un sostenido intento compensador de la población B. Sumado a ello, el aumento significativo del área celular B a partir de los 10 meses confirmaría dicha inercia compensadora. A pesar de esto, es evidente que la abrupta disminución de la masa endocrina, supera ampliamente todos los esfuerzos de la misma por compensarlo. Es probable que la causa principal del descenso del tejido endocrino, sea producto de la inducción de un proceso apoptótico mas que una deficiencia en la proliferación de dicha población. El bajo índice de detección de figuras apoptóticas en nuestros estudios, podría estar asociado a la breve manifestación de este proceso en los tejidos, por lo que la ausencia de un numero significativo de figuras apoptóticas en nuestros análisis podría deberse a que el momento de sacrificio representa sólo un instante en la vida del tejido, mas que a la inexistencia del fenómeno apoptótico.

Si bien los mecanismos del proceso de fibrosis no están del todo aclarados, la causa principal estaría asociada a la desregulación de las células estelares

pancreáticas (PSC) (Apte *y col.*, 1999; Bachem *y col.*, 1998). Se ha demostrado que esta población descrita por Bachem (1998), es la principal fuente de producción de los componentes de la matriz extracelular (ME) (colágeno tipo I, II, fibronectina) durante el desarrollo de la fibrosis (Omary *y col.*, 2007). Según numerosos autores, el TGF β sería uno de los principales factores en la regulación de la actividad de dichas células, a través de la estimulación de la síntesis y depósito de colágeno y la inhibición de proteinasas específicas (Omary *y col.*, 2007; Shek *y col.*, 2002; Yoshikawa *y col.*, 2002).

Si bien existe numerosa bibliografía que vincula a la fibrosis con la inflamación aguda y/o crónica pancreática (Bateman *y col.*, 2002; Klöppel *y col.*, 2004; Klöppel, 2007), la manifestación de estados de inflamación sistémica subclínica o de bajo grado, estarían asociados con el desarrollo del componente fibrótico de la porción insular en la DM (Homo-Delarche *y col.*, 2006; Kolb *y col.*, 2005). Esta condición "subinflamatoria" es considerada como una respuesta no específica frente al estrés metabólico/oxidativo, principal candidato de la acumulación y depósito de matriz extracelular (ME), que actuaría a través del efecto de la hiperglucemia (glucotoxicidad) y de las dislipidemias asociadas (lipotoxicidad) (Dandona *y col.*, 2004; Kolb *y col.*, 2005; Neels y Olefsky, 2006; Shoelson *y col.*, 2006).

El fenotipo obeso moderado de la cepa eSMT, podría explicar la progresiva infiltración grasa en el tejido pancreático y su contribución con el estrés metabólico planteado. Sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos específicos que vinculan dicho estrés con la fibrosis y el proceso diabético.

En relación con este último aspecto, en los últimos años ha cobrado gran relevancia la hipótesis sobre el origen inmunológico de la DM tipo 2 (Donath *y col.*, 2003; Kolb *y col.*, 2005; Homo-Delarche *y col.*, 2006). Esta hipótesis sostiene que el mencionado efecto gluco/lipotóxico estaría mediado por moléculas proinflamatorias, tales como IL-1, IL-6, TNF- α y INF- γ entre otras, ejerciendo su acción tanto sobre los tejidos blanco, originando un estado de IR, así como sobre la propia célula B, ocasionando su disfunción y/o la activación del proceso apoptótico (Neels y Olefsky, 2006; Donath *y col.*, 2005). Según esta hipótesis, el estrés metabólico ejercería su acción a través de moléculas proinflamatorias, que serían las responsables no sólo del desarrollo de un estado de IR, sino también de la inducción de la muerte de las células B (Kolb *y col.*, 2005). Si bien estos dos conceptos, el metabólico y el inmunológico, consideran como factor esencial en la

patogénesis de la DM tipo 2, el estrés ejercido por los elevados niveles de glucosa, ácidos grasos libres y triglicéridos sobre los tejidos blanco, el segundo criterio sugiere que la acción directa de los mediadores proinflamatorios, sería el mecanismo efector de la toxicidad metabólica. En efecto, este último concepto sostiene que sin la respuesta inflamatoria, la glucotoxicidad y la lipotoxicidad no serían diabetogénicas (Kolb *y col.*, 2005).

Finalmente, el análisis de los cambios observados en las ratas diabéticas eSMT, pone en evidencia la necesidad de redefinir nuevas edades de sacrificio, con el objeto de identificar y estudiar el momento preciso de la manifestación de los cambios observados en el páncreas endocrino, y de esa manera poder avanzar sobre el análisis de los mecanismos involucrados en el desarrollo de los mismos. En este sentido resultaría de especial interés, profundizar en los mecanismos que llevan al proceso de inducción de fibrosis y su vinculación con el abrupto descenso de la masa endocrina, como así también del resto de las alteraciones asociadas con la patología diabética.

Estos datos resultan de vital importancia, dada la escasa información existente con relación con los cambios morfológicos en el islote que acontecen previo y durante el desarrollo del proceso diabético tipo 2.

Si bien la glucosa es el principal regulador fisiológico de la síntesis y secreción de insulina, los niveles de lípidos y proteínas ejercen también una acción moduladora sobre la actividad de dicha hormona. De hecho, niveles elevados en forma crónica no sólo de glucosa, sino también de lípidos, ejercerían un efecto glucotóxico y/o lipotóxico sobre las células B, contribuyendo al deterioro de esta población a través del estrés oxidativo y, probablemente, mediante la inhibición de la expresión del gen de la insulina. (Bernard-Kargar *y col.*, 2001; Poitout *y col.*, 1996; Poitout *y col.*, 2002; Poitout *y col.*, 2006; Robertson *y col.*, 2004).

Dada la importancia fisiológica que posee el mantenimiento de los niveles de glucosa dentro de los límites de un estrecho rango, es importante destacar que nuestras ratas alcanzaron tempranamente valores glucémicos por encima de lo normal. Si bien se produjo un aumento estadísticamente significativo de la glucemia en los animales de mayor edad (18 meses) respecto de los animales de 2 meses (primer edad analizada en nuestros estudios), es importante resaltar que estos últimos ya presentaban niveles que se pueden considerar hiperglucémicos cuando se los compara con los valores correspondientes a ratas normales,

sugiriendo que el deterioro de la población B y los síntomas asociados al estado diabético aparecen muy tempranamente en la rata eSMT.

Una posible consecuencia de esta condición hiperglucémica temprana, sostenida en el tiempo y consolidada finalmente en los animales envejecidos, podría estar relacionada con el daño que su acumulación ejerce a nivel de los tejidos (glicosilación de las proteínas y estrés oxidativo). Es probable que durante la primera mitad de la vida de los animales, dicho efecto contribuya a la disminución de la población endocrina, y consecuentemente al descenso de los niveles de insulina plasmática. Esta situación profundizaría el cuadro hiperglucémico en los animales de mayor edad, consolidando definitivamente un estado diabético irreversible.

Por otra parte, se ha comprobado que la hiperglucemia estimula la síntesis de colágeno y fibronectina por parte de las células endoteliales y la musculatura lisa de la pared vascular, ocasionando alteraciones en los capilares tanto a nivel insular como peri-insular (Liu *y col.*, 2007; Raines, 2000). Esta sería una de las causas del desarrollo de la fibrosis insular descrita en nuestras ratas, que además podría estar vinculada con el descenso de la masa endocrina referido anteriormente.

Estas anormalidades en la vascularización del islote han sido previamente descritas en otros dos modelos espontáneos de DM tipo 2 ya mencionados (OLEFT y SDT) (Homo-Delarche *y col.*, 2006; Masuyama *y col.*, 2004).

Recientemente, ha sido demostrado en la rata GK, la manifestación de un proceso inflamatorio a nivel insular con desarrollo de lesiones vasculares y fibrosis progresiva que ocasiona la disrupción del islote y resultaría responsable además de la alteración de la fisiología de la célula B (Homo-Delarche *y col.*, 2006). Estos autores describieron además, que la progresión de la fibrosis insular está correlacionada con la presencia sostenida de un estado hiperglucémico.

La aparición de AGEs, en relación con las alteraciones descritas, esta también asociada a un estado de hiperglucemia crónica. Sin embargo, el daño en los tejidos comenzaría mucho antes de que los niveles de AGEs se manifiesten ó puedan ser detectados, ya sea a nivel plasmático o en el tejido. Esta es una de las principales razones por la cual debe considerarse como uno de los principales factores de riesgo de la patología diabética, la presencia desde temprana edad de niveles de glucosa plasmática elevados. Además, no sólo su incidencia a nivel extracelular sobre las moléculas de vida media-larga produce daños permanentes en los tejidos, sino que su acción a nivel intracelular sobre moléculas de vida media-corta

ha sido asociada con la oxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, alteraciones en la conformación molecular, actividad enzimática, etc. (Vlassara, 2003). De hecho, muchos autores sostienen que la sobrecarga temprana de glucosa intracelular sería una de las principales causas responsables del deterioro y muerte de la población B, vinculada frecuentemente con niveles elevados de TG y AGL (Boden *y col.*, 2004; Poitout *y col.*, 2002; Poitout *y col.*, 2006; Robertson *y col.*, 2003; Rhodes, 2005).

La identificación de los AGEs y su receptor (RAGE), tanto a nivel del plasma como de los tejidos de nuestros animales, resultaría de importancia para poder confirmar el efecto producido por la hiperglucemia descrita y el posible daño sobre los tejidos, y en particular sobre el páncreas endocrino.

En cuanto a la insulina, el descenso de sus niveles, sobre todo a partir de los animales que alcanzaron los 10 meses de vida, se explicaría a partir de la marcada disminución de la masa insular descrita previamente, hecho que más allá de la especulación de sus posibles causas, sería el principal motivo de la incapacidad de la rata eSMT de alcanzar niveles de insulinemia adecuados y, en consecuencia, posibilitar la normalización de los niveles de la glucosa plasmática.

Es importante destacar que el hecho de haber detectado un aumento en el tamaño de las células B, sugiere el intento de las mismas para compensar los bajos niveles de insulina producto del descenso de dicha población. Sin embargo, es evidente que el avance del deterioro tisular supera todo intento del tejido secretor por sostener los niveles de dicha hormona dentro del rango fisiológico.

Los niveles de lípidos plasmáticos, tanto los ácidos grasos libres (AGL) como los niveles de TG y CL, que frecuentemente se asocian con estados de insulino resistencia (Boyko *y col.*, 2000; Hardy *y col.*, 2002; Unger *y col.*, 1999), mostraron valores plasmáticos elevados respecto a las ratas normales.

Esta desregulación del metabolismo lipídico vinculado tanto a la obesidad como a la edad avanzada, sería la principal responsable del daño sobre las poblaciones no adipocíticas (Bergman *y col.*, 2000; Unger y Zhou, 2001; Unger y Orci, 2001). La consecuencia más severa de estas alteraciones se manifestaría a través de un tipo de muerte celular específica denominada lipoapoptosis (Unger y Orci, 2002). Este tipo de apoptosis estaría estrechamente asociado con la descompensación de las células musculares del miocardio (Zhou *y col.*, 2000) y de las células B pancreáticas (Biden *y col.*, 2004; Porte *y col.*, 2001; Shimabukuro *y col.*, 1998; Unger, 1997). Aparentemente la acumulación intracelular de TG en las células no

adipocíticas, sería la principal causa de su inducción y uno de los principales factores involucrados en el desarrollo de las patologías asociadas con la edad y la sobreingesta calórica, como la DM tipo 2 y la enfermedad cardiovascular (Assimakopoulos-Jeannet, 2004; Lazar, 2005; Unger y Orci, 2001).

Si bien no hemos estudiado el contenido de TG y CL intracelular, los niveles plasmáticos guardan una marcada correlación con los primeros, por lo que representan una importante referencia en ese sentido (Unger y Orci, 2001). Basándonos en ello podemos suponer que nuestros valores de TG y CL podrían estar relacionados con un estado dislipidémico posiblemente asociado con el estrés metabólico/oxidativo y/o con un fenómeno apoptótico que sería el responsable del descenso de la población insular.

Otro dato que confirmaría la incidencia de los lípidos en las alteraciones descritas, es el aumento en los niveles de TBARS en las ratas diabéticas respecto a las normales, especialmente en los animales de mayor edad. Estos datos estarían confirmando la mayor presencia de peroxidación lipídica en el plasma de la rata eSMT, favoreciendo nuestra suposición del daño oxidativo conjunto, ejercido por el metabolismo de los hidratos de carbono y los lípidos.

Finalmente el aumento de la presencia de pigmentos del tipo lipofucsina/hemosiderina, respecto de las ratas SD, se suma al concepto del estrés oxidativo como probable responsable de las alteraciones descritas en el parénquima pancreático.

No obstante, en futuras investigaciones, sería fundamental avanzar en éste y otros aspectos planteados previamente, con el objeto de confirmar, basados en nuestros hallazgos, las posibles causas y mecanismos de la patología diabética descrita en el modelo analizado.

CONCLUSIONES

El análisis de los resultados obtenidos en las dos cepas estudiadas demuestra que:

En la cepa SD:

- El páncreas sufrió una progresiva distorsión, especialmente en los animales de mayor edad, producto del avance de la fibrosis intersticial tanto en la porción endocrina como exocrina.
- En los animales seniles se observó un mayor grado de alteración en la estructura del parénquima pancreático, con imágenes de fragmentación y polimorfismo insular evidente.
- Respecto del páncreas endocrino, la población B fue la que evidenció mayores alteraciones.
- La glucemia no mostró variaciones a lo largo de las diferentes edades, en tanto que los valores de insulina sufrieron un aumento inicial seguido de un paulatino descenso hacia las edades terminales.
- En cuanto al perfil lipídico, sólo se observó un aumento significativo con la edad en los valores de colesterol plasmático y TBARS.

El conjunto de estos resultados refleja el efecto del envejecimiento sobre el páncreas. Uno de los datos más relevantes es el aumento de la DV de la población B en las ratas seniles junto con el descenso de la insulina plasmática, lo que sugiere una disminución de la capacidad secretora de dicha población en los animales más viejos.

En la cepa eSMT:

- Se produjo una temprana fragmentación de los islotes asociada al desarrollo progresivo de una severa fibrosis intrainsular.
- Se observó un abrupto descenso de la masa endocrina a partir de los 5 meses de edad.
- El área celular B aumentó significativamente en los animales de mayor edad, sugiriendo la existencia de un intento de compensar el descenso de la masa insular.

- El aumento de la glucosa plasmática con el desarrollo de hiperglucemia a partir de los 10 meses, estaría asociado con las alteraciones tisulares observadas, coincidiendo con el descenso de la insulinemia.
- Los TG, el colesterol y los TBARS sufrieron un aumento significativo en los animales de mayor edad, sugiriendo la participación de los lípidos en el estrés oxidativo.

En conclusión estos resultados demuestran que el desarrollo del estado diabético tipo 2 en esta cepa murina, mantiene una fuerte vinculación con el temprano deterioro del páncreas endocrino, asociado con las alteraciones de sus principales parámetros plasmáticos durante la vida de estos animales.

FUTURAS INVESTIGACIONES

Por lo expuesto, la cepa eSMT ofrece un interesante modelo espontáneo para el estudio de las probables causas y mecanismos involucrados en el desarrollo del proceso diabético. A nuestro criterio, el análisis de la misma contribuirá a la mejor comprensión del origen y fisiopatología de dicha enfermedad, y posibilitará el ensayo de terapias dirigidas al tratamiento y a la prevención de esta compleja enfermedad.

A continuación hemos resumido, los puntos más salientes del presente trabajo en dirección al desarrollo de futuras investigaciones:

Origen, desarrollo y rol de la fibrosis en la diabetes. A partir de su descripción surge el interrogante sobre su origen y naturaleza, con el fin de poder determinar su relación con la patología diabética. En función de los resultados obtenidos en el presente trabajo se planean los siguientes estudios:

- Identificar mediante técnicas inmunohistoquímicas los tipos de colágeno y proteínas asociadas al tejido conectivo, con el fin de poder caracterizar la naturaleza y composición del componente fibrótico.
- Identificar la presencia de la población folículo estelar pancreática, posible reguladora de la síntesis y remodelación del tejido conectivo, mediante la detección de la α -sma (*smooth muscle actin*), una proteína expresada por

dicha población celular, principal responsable de la síntesis de matriz extracelular (ME).

- Con relación a la presencia de dicha población, analizar la presencia de TGF- β , y correlacionar su expresión con el desarrollo de la fibrosis, la síntesis de colágeno tipo I y III y fibronectina y la posible intervención de proteinasas específicas inhibitorias (metaloproteinasas) como reguladoras de la síntesis del colágeno.

Causas asociadas al descenso del tejido endocrino. El abrupto descenso de la masa endocrina, representa uno de los hallazgos más notorios de la patología desarrollada por la cepa eSMT. Si bien hemos discutido previamente las posibles causas asociadas a dicha disminución, los análisis realizados no permiten alcanzar una conclusión definitiva al respecto. Teniendo en cuenta la ausencia de infiltrados linfocitarios, queda por dilucidar cuál o cuales podrían ser los mecanismos involucrados en dicho descenso. Dentro del modelo *in vivo* sería necesario analizar nuevos momentos de sacrificio, con el fin de intentar identificar la presencia del fenómeno apoptótico, como así también, su origen y vinculación con las patologías descriptas.

Origen inmunológico de la DM tipo 2. Como ya hemos analizado en la discusión general, dadas las características presentadas por esta línea murina, la posibilidad de que esté involucrado un proceso inflamatorio en el desarrollo de las patologías descriptas asociadas al estado diabético, contribuiría al análisis de uno de los grandes interrogantes asociado con el origen de la diabetes tipo 2. En este sentido sería importante investigar los siguientes aspectos:

- Procurar la identificación de poblaciones celulares asociadas al proceso inflamatorio, especialmente macrófagos y linfocitos.
- Analizar la presencia de mediadores proinflamatorios característicos, como el TNF α , la IL-1 β y IL-6, en relación con el desarrollo de la fibrosis y la presencia de la población estelar pancreática, además de la ya referida expresión de TGF- β , como regulador de la síntesis de colágeno.
- Identificar la presencia y expresión de los receptores Toll (TLR) debido a su demostrada vinculación con los procesos inflamatorios autoinmunes (Verstak *y col.*, 2007).

BIBLIOGRAFÍA

Andrew A. An experimental investigation into the possible neural crest origin of pancreatic APUD (islet) cells. *J. Embryol. Exp. Morph.* 35: 577-593. (1976)

Apelqvist A., Li H., Sommer L, Beatus P., Anderson D. J., Honjo T., Hrabe de Angelis M., Lendhal U., and Edlund H. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400: 877-881. (1999)

Apte M. V., Haber P. S., Darby S. J., Rodgers S. C., McCaughan G. W., Korsten M. A., Pirola R. C., Wilson J. S. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 44: 534-541. (1999)

Arvan P. and Castle D. Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem.J.* 332: 593-610. (1998)

Ashcroft S. J., Ashcroft F. M. Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal.* 2 (3): 197-214. (1990)

Ashcroft F. M. and Rorsman P. Electrophysiology of the pancreatic B-cell. *Prog Biophys molec Biol.* 54: 87-143. (1991)

Assimacopoulos-Jeannet F. Fat storage in pancreas and in insulin-sensitive tissues in pathogenesis of type 2 diabetes. *International Journal of Obesity* 28: S53-S57. (2004)

Atkinson M. A., Maclaren N. K. Islet cell autoantigens in insulin-dependent diabetes. *J. Clin Invest.* 92: 1608-1616. (1993)

Atkinson M. A., Maclaren N. K. The Pathogenesis of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med* 331: 1428-1436. (1994)

Bachem M. G., Schneider E., Groß H., Weidenbach H., Schmid R. M., Menke A., Siech M., Beger H., Grünert A., Adler G. Identification: culture: and characterisation of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology*: 115: 421-432. (1998)

Barzilai N. and Gupta: G. Revisiting the role of fat mass in the life extension induced by caloric restriction. *Journal of Gerontology Biological Sciences* 54 A: B89-B96. (1999)

Bateman A. C., Turner S. M., Thomas K. S. A., McCrudden P. R., Fine D. R., Johnson P. A., Johnson C. D., Iredale J. P. Apoptosis and proliferation of acinar and islet cells in chronic pancreatitis: evidence for differential cell loss mediating preservation of islet function. *Gut* 50: 542-548. (2002)

Bearer, E. L., Orci: L. Endothelial Fenestral Diaphragms: A Quick-Freeze: Deep-Etch Study. *The Journal of Cell Biology* 100: 418-428. (1985)

Beckman K. B. and Ames B. N. Mitochondrial aging: Open questions. *Annals New York Academy of Sciences* 854: 118-127. (1998)

Beckman K. B. and Ames B. N. The free radical theory of aging matures. *Physiol Reviews* 78(2): 547-581. (1998)

Bendayan M. Presence of endocrine cells in pancreatic ducts. *Pancreas* 2: 393-397. (1987)

Bergman R. N. and Ader M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 11: 351-356. (2000)

Bernard C., Berthault M-F., Saulnier C., and Ktorza A. Neogenesis vs. apoptosis as main components of pancreatic B cell mass changes in glucose-infused normal and mildly diabetic adult rats. *FASEB J* 13: 1195-1205. (1999)

Bernard C. and Ktorza A. Endocrine pancreas plasticity under physiological and pathological conditions. *Diabetes* 50: Suppl 1: s30-s35. (2001)

Biden T.J., Robinson D., Cordery D., Hughes W. E., Busch A. K. Chronic effects of fatty acids on pancreatic B-cell function. New insights from functional genomics. *Diabetes* 53 (S1): S159-S165. (2004)

Bjorksten J. The crosslinkage theory of aging. *J Am Geriatr Soc.* 16(4): 408-27. (1968)

Blackburn E. Telomeres: Structure and synteshis. *J Biol Chem* 265 (11): 5919-5921. (1990)

Blackburn E. Switching and signalling at the telomere. *Cell* 106: 661-673. (2001)

Boden G. and Laakso M. Lipids and glucose in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27(9) : 2253-2259. (2004)

Bonner-Weir S. Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol* 24: 297-302. (2000)

Bonner-Weir S. Life and death of the pancreatic B-cells. *Trends Endocrinol Metab* 11: 375-378. (2000)

Bonner-Weir S. B-cell Turnover: Its assessment and Implications. *Diabetes* 50: Suppl. 1: s20-s24. (2001)

Bonner-Weir S., Deery D., Leahy J. L. and Weir G. C. Compensatory growth of pancreatic B-cells in adult rats after short-term (96hr) glucose infusion. *Diabetes* 38: 49-53. (1989)

Bonner-Weir S., Orci L. New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes* 31: 883-889. (1982)

Bouwens L. and De Blay E. Islet morphogenesis and stem cell markers in rat pancreas. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 44: 947-951. (1996)

Bouwens L. Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet beta-cells in the pancreas. *Microsc Res Tech* 43: 332-336. (1998)

Bouwens L. Cytokeratins and cell differentiation in the pancreas. *J Pathol* 184: 234-239. (2000)

Boyko E. J., Fujimoto W. Y., Leonetti D. L., Newell-Morris L. Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 23: 465-471: (2000)

Calderari S. A., Martínez S. M., Tarrés M. C., Picena J. C., Rabasa S. L. Modelos hereditarios de diabetes y obesidad humanas en líneas endocriadas de ratas vinculadas por ascendencia. *Mendeliana* 11: 47-55. (1995)

Carson D. A. and Ribeiro J. M. Apoptosis and disease. *Lancet* 341: 1251-1254. (1993)

Cavaghan M. K., Ehrmann D. A., and Polonsky K. S. Interactions between insulin resistance and insulin secretion in the development of glucose intolerance. *J Clin Invest* 106: 329-333. (2000)

Cerami A., Vlassara H., and Brownlee M. Glucosa y envejecimiento. *Invest y Ciencia* 130: 52-59. (1987)

Chandra J., Zhivotovsky B., Zaitsev S., Juntti-Berggren L., Per-Olof Berggren and Orrenius S. Role of apoptosis in Pancreatic B-cell death in diabetes. *Diabetes* 50: Suppl. 1: s44-s47. (2001)

Chang A. M., Halter J. B. Aging and insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284: E7-E12. (2003)

Chiasson J. L., Rabasa-Lhoret R. Prevention of type 2 diabetes: insulin resistance and beta-cell function. *Diabetes* 53 (S 3) :S34-8. (2004)

Clark A., Jones L. C., de Koning E., Hansen B. C., and Matthews D. R. Decreased insulin secretion in type 2 diabetes: a problem of cellular mass or function? *Diabetes* 50: Suppl. 1: s169-s171. (2001)

Cockburn B. N., Ostrega D. M., Sturis J., Kubstrup C., Polonsky K. S., Bell G. I. Changes in pancreatic islet glucokinase and hexokinase activities with increasing age: obesity: and the onset of diabetes. *Diabetes*. 46 (9): 1434-9. (1997)

Collins K. Mammalian telomeres and telomerase. *Curr Opin Cell Biol* 12: 378-383. (2000)

Coordt M.C., Ruhe R.C., and McDonald R.B. Ageing and insulin secretion. *Proc Soc Exp Biol Med* 209 (3): 213-222. (1995)

Cui Y., Chen R. S., and Wong W. H. The coevolution of cell senescence and diploid sexual reproduction in unicellular organisms. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America* 97: 3330-3335. (2000)

Cummings M. C., Winterford C., and Walker N. I. Apoptosis. *Am J Surg Pathol* 21: 88-101. (1997)

Dandona P., Aljada A., Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in Immunology* 25 (1): 4-7. (2004)

Das M., Gabriely I., Barzilai N. Caloric restriction, body fat and aging in experimental models. *Obesity Research* 5:13-19. (2004)

De Clercq L., Deleare P., and Remacle C. The aging of the endocrine pancreas of the rat. II. Cytoplasmic parameters of the B-cell: including insulin synthesis and secretion. *Mechanisms of Ageing and Development* 43: 25-44. (1988)

De Clercq L., Delaere P., and Remacle C. The aging of the endocrine pancreas of the rat. I. Parameters of cell proliferation. *Mechanisms of Ageing and Development* 43: 11-24. (1988)

De Fronzo R. A. Glucose intolerance of ageing. *Diabetes Care* 4: 493-513. (1984)

De Fronzo R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Reviews* 5: 177-269. (1997)

Dillberger J. E. Age-related pancreatic islet changes in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol* 22 (1): 48-55. (1994)

Donath M. Y., Ehses J. A., Maedler K., Schumann D. M., Ellingsgaard H., Eppler E. & Reinecke M. Mechanisms of B-Cell Death in Type 2 Diabetes *Diabetes* 54 (S 2): S108-S113. (2005)

Donath M. Y., Storling J., Maedler K., Mandrup-Poulsen T. Inflammatory mediators and islet β -cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *J Mol Med* 81: 455-470. (2003)

Dor Y., Brown J., Martinez O. I., and Melton D. A. Adult pancreatic B-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429: 41-46. (2004)

Draznin B., Steinberg J. P., Leitner J. W., and Sussman, K. E. The nature of insulin secretory defect in ageing rats. *Diabetes* 34: 1168-1173. (1985)

Edlund H. Pancreas: how to get there from the gut? *Curr Opin Cell Biol* 11: 663-668. (1999)

Edlund H. Developmental biology of the pancreas. *Diabetes* 50: Suppl. 1: s5-s9. (2001)

Elahi D., Muller D. C., Andersen D. K., Tobin J. D., Andres R. The effect of age and glucose concentration on insulin secretion by the isolated perfused rat pancreas. *Endocrinology* 116: 11-16 (1985)

Falkmer S. Comparative morphology of pancreatic islets in animals. In *The Diabetic Pancreas* 2nd edition. (ed. Volk: B. W. and Arquilla: E. R.):pp. 17-52 New York: Plenum. (1985)

Fargnoli J., Kunisada T., Fornace A. J. Jr., Schneider E. L., Holbrook N.J. Decreased expression of heat shock protein 70 mRNA and protein after heat treatment in cells of aged rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(2): 846-50. (1990)

Ferré P. The Biology of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. Relationship With Lipid Metabolism and Insulin Sensitivity. *Diabetes* 53 S (1): s43-a50. (2004)

Finegood D.T., Scaglia L., Bonner-Weir S. Dynamics of B-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 44: 249-256: (1995)

Fink R. I., Kolterman O. G., Griffin J., Olefsky J. M. Mechanisms of insulin resistance in aging. *J Clin Invest.* 71(6): 1523-35. (1983)

Fujimoto W., Leonetti D., Kinyoun J., *et al.* Prevalence of complications among second-generation Japanese-american men with diabetes: impaired glucose tolerance or normal glucose tolerance. *Diabetes* 36: 730- (1987)

Fujita T. Insulo-acinar portal system in the horse pancreas. *Arch Histol Jpn.* 35 (2): 161-71. (1973)

Fujita T, Murakami T. Microcirculation of monkey pancreas with special reference to the insulo-acinar portal system. A scanning electron microscope study of vascular casts. *Arch Histol Jpn.* 35 (4): 255-63. (1973)

Gagliardino J. J., Rebolledo O., Gómez Dumm C. L. A., Cortizo A. M., Borelli M. I. Fisiología del Islote. Cap 2, 7-46. de *Diabete Mellitus* de Maximino Ruiz, segunda edición, Ed. Akadia. (1994)

Garvey W. T., Huecksteadt T. P., Matthaei S., Olefsky J. M. Role of glucose transporters in the cellular insulin resistance of type II non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 81 (5): 1528-36. (1988)

Georgia S., Bhushan A. B-cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal B-cell mass. *J Clin Invest.* 114 (7): 963-968. (2004)

Gerber S. H. and Südhof T. C. Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes* 51: S3-S11. (2002)

Gerich J. E. Is Reduced First-Phase Insulin Release the Earliest Detectable Abnormality in Individuals Destined to Develop Type 2 Diabetes? *Diabetes* 51 S117-S121. (2002)

Gittes G. Galante P., Hanahan D., Rutter W., Debas H. Lineage specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors. *Development* 122: 439-447. (1996)

Gómez Dumm C. L. A., Semino M. C., Gagliardino J. J. Quantitative morphological changes in endocrine pancreas of rats with spontaneous diabetes mellitus. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 57: 375-381. (1989)

Gómez Dumm C. L. A., Semino M. C., Gagliardino J. J. Sequential morphological changes in pancreatic islets of spontaneously diabetic rats. *Pancreas* 5: 533-539. (1990)

Gredilla R., Barja G. The role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology* 146 (9): 3713 -7. (2005)

Gu G., Dubauskaite J. and Melton D. A. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129: 2447-2457. (2002)

Hajdu A., Herr F., Rona G. The functional significance of a spontaneous pancreatic islet change in aged rats. *Diabetes* 16: 108-110. (1967)

Hajdu A. and Rona G. Morphological observations on spontaneous pancreatic islet changes in rats. *Diabetes* 16: 108-110. (1967)

Hanke J. Apoptosis and occurrence of Bcl-2: Bak: Bax: Fas and FasL in the developing and adult rat endocrine pancreas. *Anat Embryol.* 202: 303-312. (2000)

Hardy R. W., Meckling-Gill K. A., Williford J., Desmond R. A., Wei H. Energy restriction reduces long-chain saturated fatty acids associated with plasma lipids in aging male rats. *J Nutr.* 132 (10): 3172-7. (2002)

Harman D. The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7124-7128: (1981)

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 2: 298-300. (1956)

Hayflick L., Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621. (1961)

Hayflick L., Living forever and dying in the attempt. *Experimental Gerontology* 38: 1231-1241. (2003)

Hebrok M., Kim S. K. and Melton D. A. Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev.* 12: 1705-1713. (1998)

Hebrok M., Kim S. K., St-Jacques B., McMahon A. P., and Melton D. A. Regulation of pancreatic development by hedgehog signaling. *Development* 127: 4905-4913. (2000)

Heilbronn L. K., Ravussin E. Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am J Clin Nutr.* 78 (3): 361-9. (2003)

Herbert V., Lau K.S., Gottlieb Ch.W. and Bleicher S. J. Coated-charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocrinol Metabol* 25: 1375: (1965)

Hill D. J. and Duvillié B. Pancreatic development and adult diabetes. *Pediatric Research* 48 N° 3: 269-274. (2000)

Hisatomi M., Hidaka H., Niki I. Ca²⁺/calmodulin and cyclic 3':5' adenosine monophosphate control movement of secretory granules through protein phosphorylation/dephosphorylation in the pancreatic beta-cell. *Endocrinology.* 137 (11): 4644-9. (1996)

Homo-Delarche F. Is pancreas development abnormal in the non-obese diabetic mouse: a spontaneous model of type I diabetes? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 34: 437-447. (2001)

Homo-Delarche F., Calderari S., Irminger J-C., Gangnerau M-N., Coulaud J., Rickenbach K., Dolz M., Halban P., Portha B. and Serradas P. Islet Inflammation and Fibrosis in a Spontaneous Model of Type 2 Diabetes: the GK Rat. *Diabetes* 55: 1625-1633. (2006)

Hong E-G, Noh H-L, Lee S, Chung Y-S, Lee K-W, and Kim H-M. Insulin and glucagon secretions: and morphological change of pancreatic islet in OLETF rats: a model of Type 2 diabetes mellitus. *J Korean Med Sci* 17: 34-40. (2002)

Horie K., Miyata T., Yasuda T., Takeda A., Yasuda Y., Maeda K., Sobue G., and Kurokawa K. Immunohistochemical localization of advanced glycation end products: pentosidine: and carboxymethyllysine in lipofuscin pigments of Alzheimer's disease and aged neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 327-332. (1997)

Horie K., Miyata T., Maeda K., Miyata S., Sugiyama S., Sakai H., van Ypersele de Strihou C., Monnier V. M., Witztum J., and Kurokawa K. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. *J Clin Invest* 100 (12): 2995-3004. (1997)

Hubert M. F., Laroque P., Gillet J. P., Keenan K. P. The effects of diet: ad Libitum feeding: and moderate and severe dietary restriction on body weight: survival: clinical pathology parameters: and cause of death in control Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci.* 58 (1): 195-207. (2000)

Hui H. and Perfetti R. Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. *European Journal of Endocrinology* 146: 129-141. (2002)

Jackson R. A. Mechanism of age-related glucose tolerance. *Diabetes Care* 13: 9-19. (1990)

Janssen S.W., Hermus A.R., Lange W.P., Knijnenburg Q., van der Laak J.A., Sweep C.G., Martens G.J., Verhofstad A.A. Progressive histopathological changes in pancreatic islets of Zucker Diabetic Fatty rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 (5): 273-82. (2001)

Jazwinski S. M. The genetics of aging in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetica*. 91(1-3): 35-51. (1993)

Jazwinski S. M. Longevity: genes and aging. *Science* 273: 54-59 (1996)

Johnson T. E. Increased life-span of age-1 mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging. *Science* 249 (4971): 908-12. (1990)

Johnson T. E. Genetic influences on aging. *Experimental Gerontology* 32: 11-22. (1997)

Jonas J-C., Sharma A., Hasenkamp W., Ilkova H., Patanè G., Leybutt R., Bonner-Weir S., Weir G. C. Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic B-cell differentiation in an animal model of diabetes. *J. Biol. Chem.* 274: 14112-14121. (1999)

Kahn B. B. Facilitative glucose transporters: Regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J Clin Invest* 89: 1367-1374. (1992)

Kahn, B. B. Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell*. 92: 593-596. (1998)

Kahn B. B. and Flier J. S. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106 (4): 473-481. (2000)

Kahn C. R. Banting Lecture. Insulin action: diabetogenes: and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 43 (8): 1066-84. (1994)

Kahn S. E. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46: 3-19. (2003)

Kanugo M.S. Biochemistry of ageing. *Biochem Rev* 41: 13-18: (1970)

Kaufman D. L., Erlander M. G., Clare-Salzler M., Atkinson M. A., Maclaren N. K., Tobin A. J. Autoimmunity to two forms of glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 89 (1): 283-92. (1992)

Kerr J. F. R., Searle J., Harmon B. V., and Bishop C. J. *Apoptosis.* 93-128. (1987)

Kim S. K., MacDonald R. J. Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development.* 12: 540-547 (2002)

Kim S. K., Hebrok M., and Melton D. A. Notochord to endoderm signalin is required for pancreatic development. *Development* 124: 4243-4252. (1997)

Kirkwood T. B. L. Immortality of the germ-line versus disposability of the soma. *Basic Life Sci.* 42: 209-18. (1987)

Kirkwood T. B. L. Evolution of ageing . *Mechanisms of Ageing and Development* 123: 737-745. (2002)

Kliwer S. A. and Willson T. M. The nuclear receptor PPAR γ - bigger than fat. *Curr Opin Genet Dev* 8: 576-581. (1998)

Kliwer S. A., Lehmann J. M., and Willson T. M. Orphan nuclear receptors: Shifting endocrinology into reverse. *Science* 284: 757-760. (1999)

Klimstra D. S. Pancreas: from *Histology for Pathologists second edition*. Ed. by Sternberg: S. S. Lippincott-Raven Pub. Cap. 27: 613-643. (1997)

Köppel G. Toward a new classification of chronic pancreatitis. *J Gastroenterol* 42 [Suppl XVII]: 55-57. (2007)

Klöppel G., Detlefsen S., Feyerabend B. Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern. *Virchows Arch.* 445 (1):1-8. (2004)

Klöppel G., Lohr M., Habich K., Oberholzer M., Heitz P.U. Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv Synth Pathol Res* 4: 110 -125. (1985)

Ko S.H., Kwon H. S. Kim S. R., Moon S. D., Ahn Y. B., Song K. H., Son H. S., Cha B. Y., Lee K. W., Son H. Y., Kang S. K., Park C. G., Lee I. K., Yoon K. H. Ramipril treatment suppresses islet fibrosis in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 114 -122: (2004)

Kolb H., Mandrup-Poulsen T. An immune origin of type 2 diabetes? *Diabetologia* 48: 1038 -1050. (2005)

Koricanac G., Vulovic M., Radivojsa S., Zakula Z. & Ribarac-Stepic N. Age-related changes of insulin receptors: plasma insulin and glucose level. *Biogerontology* 5: 345-353. (2004)

Koubova J., Guarente L. How does calorie restriction work? *Genes Dev.* 17(3): 313-21. (2003)

Koyama M., Wada R., Sakuraba H., Mizukami H., and Yagihashi S. Accelerated Loss of Islet B Cells in Sucrose-Fed Goto-Kakizaki Rats: a Genetic

Model of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Am J Pathol* 153: 537-545. (1998)

Kuliawat R. and Arvan P. Distinct molecular mechanisms for protein sorting within immature secretory granules of pancreatic B-cells. *The Journal of Cell Biology* 126: 77-86. (1994)

Laguesse M. E. Première études du développement histogénique dans le pancréas du mouton. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 47: 699. (1895)

Lammert E., Cleaver O., and Melton D. A. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 294: 565-567. (2001)

Lang J. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur J Biochem* 259: 3-17. (1999)

Lazar M. A. How Obesity Causes Diabetes: Not a Tall Tale. *Science* 307 (21): 373-375. (2005)

Leahy J. L. Impaired B-cell function with chronic hyperglycemia: "overworked B-cell" hypothesis. *Diabetes Reviews* 4 (3): 298-319. (1996)

Lefebvre V. H., Otonkoski T., Ustinov J., Huotari M. A., Pipeleers D. G., Bouwens L. Culture of adult human islet preparations with hepatocyte growth factor and 804G matrix is mitogenic for duct cells but not for beta-cells. *Diabetes* 47(1): 134-7. (1998)

Liu H. and Potter E. Development of the human pancreas. *Archives of Pathology* 74: 53-66. (1962)

Liu X., Luo F., Pan K., Wu W. and Chen H. High glucose upregulates connective tissue growth factor expression in human vascular smooth muscle cells. *BMC Cell Biology* 8:1 (2007)

Maedler K., Donath M. Y. B-cells in type 2 diabetes: A loss of function and mass. *Horm Res* 62 (suppl 3): 67-73. (2004)

Malaisse W.J., Kawazu S., Herchuelz A., Hutton J.C., Somers G., Devis G, Sener A. The stimulus secretion coupling of glucose-induced insulin release. *Arch Biochem Biophys*. 194(1): 49-62. (1979)

Malaisse W. J., Malaisse-Lagae F., Walker M. O., Lacy P. E. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. V. The participation of a microtubular-microfilamentous system. *Diabetes* 20 (5): 257-65. (1971)

Maldonado T. S., Kadison A. S., Crisera C. A, Grau J. B., Alkasab S. L., Longaker M. T., and Gittes G. K. Ontogeny of Activin B and Follistatin in developing embryonic mouse pancreas: Implications for lineage selection. *J Gastrointest Surg* 4: 269-275. (2000)

Mandrup-Poulsen T. B-cell apoptosis. Stimuli and signaling. *Diabetes* 50: s58-s63. (2001)

Martinez S. M., Tarres M. C., Picena J. C, Montenegro S. M., Gagliardino J. J., Gomez Dumm C. L. A., D'Ottavio A. E., Naves A., and Rabasa S. L. eSS rat: an animal model for the study of spontaneous non-insulin-dependent diabetes. E.Schafirir. *Lessons from animal diabetes IV*. [8]: 75-90. (1993)

Matschinsky F., Liang Y., Kesavan P., Wang L., Froguel P., Velho G., Cohen D., Permutt M. A., Tanizawa Y., Jetton T. L., Niswender K., and Magnuson M. A. Glucokinase as pancreatic B-cell glucose sensor and diabetes gene. *J. Clin. Invest*. 92: 2092-2098. (1993)

Martinez S. M., Tarres M. C., Picena J. C., Montenegro S. M., Gagliardino J. J., Gomez Dumm C. L. A., D'Ottavio A. E., Naves A., Rabasa S. L. eSS rat: an animal model for the study of spontaneous non-insulin-dependent diabetes. *Lessons from animal diabetes IV* Ed. E. Shafirir: Smith-Gordon 75-90. (1993)

Martinez S. M., Tarres M. C., Montenegro S. M., Varela M., Torrano A., D'Ottavio A. E., Naves A., Picena J. C. Effects of dietary sucrose option on the diabetic syndrome of the eSS rat. *Israel J Med Sci* 30: 761-766. (1994)

Masuyama T., Komeda K., Hara A., Noda M., Shinohara M., Oikawa T., Kanazawa Y., Taniguchi K. Chronological characterization of diabetes development in male Spontaneously Diabetic Torii rats. *Biochem Biophys Res Commun* 314: 870-877. (2004)

McCarthy A. D. Glicosilación no enzimática de proteínas: su rol en las complicaciones crónicas de la diabetes y el envejecimiento. *Acta Bioq Clin Latinoam* 29(2): 173-190. (1995)

McClearn G. E. Biogerontologic theories. *Experimental Gerontology* 32: 3-10. (1997)

McDuffie M. Genetics of autoimmune diabetes in animal models. *Curr Opin Immunol* 10: 704-709. (1999)

McEvoy R. C. and Madson K. L. Pancreatic insulin-: glucagon-: and somatostatin-positive islet cell populations during the perinatal development of the rat. *Biology of the Neonate* 38: 248-254. (1980)

McEvoy R. C. Changes in the volumes of the A-:B-: and D-cell populations in the pancreatic islets during the postnatal development of the rat. *Diabetes* 30: 813-817. (1981)

Meites J. Remembrance: neuroendocrinology and aging. A perspective. *Endocrinology* 130(6): 3107-8. (1992)

Meites J., Goya R.G.: Takahashi S. Why the neuroendocrine system is important in aging process. *Exp Gerontol* 22: 1-5. (1987)

Miralles F., Czernichow P., and Scharfmann R. Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. *Development* 125: 1017-1024. (1998)

Miralles F., Serup P., Cluzeaud F., Vandewalle A., Czernichow P., and Scharfmann R. Characterization of B-cells developed in vitro from rat embryonic pancreatic epithelium. *Developmental Dynamics* 214: 116-126. (1999)

Miralles F. and Portha B. Early development of B-cells is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. *Diabetes* 50: s84-s88. (2001)

Moller N., Gormsen L., Fuglsang J., and Gjedsted J. Effects of ageing on insulin secretion and action. *Horm Res* 60: 102-104. (2003)

Molon-Noblot S., Keenan K. P., Coleman J. B., Hoe C-M., Laroque P. The effects of ad libitum overfeeding and moderate and marked dietary restriction on age-related spontaneous pancreatic islet pathology in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol* 29 (3): 353-362. (2001)

Movassat J., Saulnier C., Serradas P., Portha B. Impaired development of pancreatic beta-cell mass is a primary event during the progression to diabetes in the GK rat. *Diabetologia* 40: 916 -925. (1997)

Murtaugh L. C. Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. *Development* 134: 427-438. (2007)

Murtaugh L. C., Stanger B. Z., Kwan K. M., Melton D. A. Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc Natl Acad Sci. USA* 100: 14920-14925. (2003)

Neels J. G. and Olefsky J. M. Inflamed fat: what starts the fire? *J. Clin. Invest.* 116: 33-35. (2006)

Newman B., Selby J. V., King M. C., Slemenda C., Fabsitz R., Friedman G. D. Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. *Diabetologia*. 30 (10): 763-8. (1987)

Nielsen J. H. and Serup P. Molecular basis for islet development: growth: and regeneration. *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes* 5: 97-107. (1998)

Nielsen J. H., Galsgaard E. D., Moldrup A., Nissen Friedrichsen B., Billestrup N., Hansen J. A., Lee Y., and Carlsson C. Regulation of B-cell mass by hormones and growth factors. *Diabetes Suppl.* 1: s25-s29. (2001)

Ohkawa, H., y col. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358. (1979)

Olefsky J. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. *J Clin Invest* 106: 467-472. (2000)

Omary M. B., Lugea A., Lowe A. W., and Pandol S. J. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest* 117: 50-59 (2007).

Orci L. Macro- and micro-domains in the endocrine pancreas. *Diabetes* 31 (6 Pt 1): 538-65. (1982)

Orci L., Vassalli J-D., Perrelet A. La fábrica de insulina. *Investigación y ciencia* (Edición en español de Scientific American) 146: 52-63. (1988)

Orgel L. E. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and the relevance to ageing. *Proc Natl Acad Sci. USA* 49: 517-521. (1963)

Park I. and Bendayan M. Development of the endocrine cells in the rat pancreatic and bile duct system. *Histochemical Journal* 25: 807-820. (1993)

Pearse A. Islet cell precursors are neurons. *Nature* 295: 96. (1982)

Pick A., Clark J., Kubstrup C., Levisetti M., Pugh W., Bonner-Weir S., and Polonsky K. S. Role of apoptosis in failure of B-cell mass compensation for insulin resistance and B-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes* 47: 358-364. (1998)

Pictet R. L., Clark W. R., Williams R. H., and Rutter W. J. An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Developmental Biology* 29: 436-467. (1972)

Pictet R. and Rutter W. J. Development of the embryonic endocrine pancreas. In *Handbook of Physiology*: section 7: vol. 1: American Physiological Society (ed. Steiner: D. F. and Frenkel: N.): pp. 25-66. Washington DC: Williams and Wilkins. (1972)

Pipeleers D. Heterogeneity in pancreatic B-cell population. *Diabetes* 41: 777-781. (1992)

Plachot C., Movassat J., Portha B. Impaired B-cell regeneration after partial pancreatectomy in the adult Goto-Kakizaki rat: a spontaneous model of type II diabetes. *Histochem Cell Biol* 116: 131-139. (2001)

Poitout V., Hagman D., Stein R., Artner I., Robertson R. P., Harmonz J. S. Regulation of the Insulin Gene by Glucose and Fatty Acids. *J Nutr* 136: 873-876. (2006)

Poitout V. and Robertson R. P. An integrated view of B-cell dysfunction in type-II diabetes. *Annu Rev Med* 47: 69-83. (1996)

Poitout V. and Robertson R. P. Minireview: Secondary B-cell failure in type 2 diabetes - A convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143 (2): 339-342. (2002)

Polonsky K. S., Given B. D., Van Cauter E. Twenty-four-hour profiles and

pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 81: 442-448. (1988)

Porte Jr., D and Kahn, S. E. B-cell dysfunction and failure in type 2 diabetes. *Potential mechanisms. Diabetes* 50: Suppl. 1: s160-s163. (2001)

Preisig P. What makes cells grow larger and how they do it ? *Experimental Nephrology* 7: 273-283. (1999)

Prescott J. and Blackburn E. H. Telomerase: Dr Jekyll or Mr Hyde ? *Curr Opin Genet Dev* 9: 368-373. (1999)

Quay W. Pancreatic regulation of nutrient metabolism. In: Hormones and Aging. P. Timiras: W. Quay: A. Vernadakis Eds. CRC Press: Boca Raton. (1995)

Raines E. W. The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease. *Int J Exp Pathol* 81:173-182. (2000)

Rajan A. S., Aguilar-Bryan L., Nelson D. A., Yaney G. C, Hsu W. H., Kunze D. L., Boyd III A. E. Ion channels and insulin secretion. *Diabetes Care* 13: 340-363. (1990)

Reaven G. M. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1607. (1988)

Reaven E. P., Curry D., Moore J., Reaven G. M. Effect of age and environmental factors on insulin release from the perfused pancreas of the rat. *J Clin Invest* 71: 345-350. (1983)

Reaven E. P., Gold G., Reaven G. M. Effect of age on glucose-stimulated insulin release by the beta cell of the rat.. *J Clin Invest* 64: 591-599. (1979)

Reaven E. P., Reaven G. M. Structure and function changes in the endocrine pancreas of aging rats with reference to the modulating effects of exercise and caloric restriction. *J Clin Invest* 68: 75-84. (1981)

Rhodes C. J. Type 2 Diabetes—a Matter of B-Cell Life and Death? *Science* 307: 380 – 384. (2005)

Riccillo F. L., Bracamonte M. I., Cónsole G. M. and Gómez Dumm C. L. A. Histomorphological and quantitative immunohistochemical changes in the rat pancreas during aging. *Biocell* 28 (2): 127-134. (2004)

Rikans L. E. and Hornbrook K. R. Lipid peroxidation: antioxidant protection and aging. *Biochem Biophys Acta* 1362: 116-127. (1997)

Robertson R. P., Harmon J., Tran P-O., Tanaka Y., and Takahashi H. Glucose toxicity in B-cells: Type 2 diabetes: good radicals gone bad: and the glutathione connection. *Diabetes* 52: 581-587. (2003)

Robertson R. P., Harmon J., Tran P-O., Poitout V. Cell Glucose Toxicity: Lipotoxicity: and Chronic Oxidative Stress in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 53, (S1) s119 - s124. (2004)

Rowe J. W., Minaker K. L., Pallotta J. A., Flier J. S. Characterization of the insulin resistance of aging. *J Clin Invest.* 71(6): 1581-7. (1983)

Ruhe R. C., Curry D. L., and McDonald R. B. Altered cellular heterogeneity as a possible mechanism for the maintenance of organ function in senescent animals. *J Gerontol A Biol Sci* 52 (1): B53-58. (1997)

Sacher G. A. Life table modification and life prolongation: in *Handbook of the Biology of Aging*. Finch: C.E. and Hayflick: L.: Eds. Van Nostrand Reinhold: New York. 582- (1977)

Samorajski T. Central neurotransmitter substances and aging: a review. *J Am Geriatr Soc.* 25(8): 337-48. (1977)

Scaglia L., Cahill C. J., Finegood D. T., and Bonner-Weir S. Apoptosis participates in the remodeling of endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology* 138: 1736-1741. (1997)

Sedivy J. M. Can ends justify the means?: Telomeres and the mechanisms of replicative senescence and immortalization in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9078-9081. (1998)

Semsei I. On the nature of aging. *Mechanisms of Ageing and Development* 117: 93-108. (2000)

Shafrir E. Animal Models of Non-insulin- Dependent Diabetes. *Diabetes/Metab Rev* 8 N°3: 179-208. (1992)

Shafrir E., Ben-Sasson R., Ziv E, and Bar-On H. Insulin resistance: B-cell survival: and apoptosis in type 2 diabetes: animal models and human implications. *Diabetes Reviews* 7(2): 114-123. (1999)

Shek F W-T., Benyon R. C., Walker F. M., McCrudden P. R., Pender S. L., Williams E. J., Johnson P. A., Johnson C. D., Bateman A. C., Fine D. R. and Iredale J. P. Expression of transforming growth factor- β 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis. *Am J Pathol* 160:1787-1798. (2002)

Shepherd P. R., and Kahn B. B. Glucose transporters and insulin action-- implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 341: 248-257. (1999)

Shimabukuro M., Ohneda M., Lee Y., and Unger R. H. Role of nitric oxide in obesity-induced B-cell disease. *J Clin Invest* 100(2): 290-295. (1997)

Shimabukuro M., Wang M-Y., Zhou Y-T., Newgard C. B., and Unger R. H. Protection against lipoapoptosis of B-cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci. USA* 95: 9558-9561. (1998)

Shimabukuro M., Zhou Y-T., Levi M., and Unger R. H. Fatty acid-induced B-cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci. USA* 95: 2498-2502. (1998)

Shoelson S. E., Lee J., Goldfine A. B. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116 (7): 1793-1801. (2006)

Shu S., Ju G., and Fan L. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neuroscience letters* 83: 169-171. (1988)

Slack J. M. W. Developmental biology of the pancreas. *Development* 121: 1569-1580. (1995).

Slavin B. G., Lerner S. P. Age-related immunohistochemical studies of A and D cells in pancreatic islets of C57BL/6J mice. *Anat. Rec.* 228: 53-7. (1990)

Smith P. A., Rorsman P., Ashcroft F. M. Modulation of dihydropyridine-sensitive Ca^{+2} channels by glucose metabolism in mouse pancreatic beta-cells. *Nature* 342 (6249): 550-3. (1989)

Sohal R. S. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology & Medicine*: 33: 1: 37-44. (2002)

Sohal R. S. and Weindruch R. Oxidative stress: caloric restriction: and aging. *Science* 273: 5: 59-63. (1996)

Somers G., Blondel B., Orci L., Malaisse W.J. Motile events in the pancreatic endocrine cells. *Endocrinology* 104: 255-264. (1979)

St-Onge L., Wehr R., and Gruss P. Pancreas development and diabetes. *Curr Opin Genet Dev* 9: 295-300. (1999)

Stagner J. I. and Samols E. The vascular order of islet cellular perfusion in the human pancreas. *Diabetes* 41: 93-97. (1992)

Steil G., Trivedi N., Jonas J-C., Hasenkamp W.M., Sharma A., Bonner-Weir S. and Weir G.C. Adaptation of B-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E788-E796. (2001)

Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1449. (1995)

Stewart E. J., Madden R., Paul G., Taddei F. Aging and death in an organism that Reproduces by morphologically symmetric division. *PLoS Biol* 3(2): e45: 295-300. (2005)

Story J. A., Gomolinski E., Czarnecki S. K., Tepper S. A., Kritchevsky D. Age-strain interrelations in lipid metabolism of rats. *Lipids* 16 (2): 87-92. (1981)

Swenne I. Effects of Aging on the regenerative capacity of the pancreatic B-cell of the rat. *Diabetes* 32: 14-19. (1983)

Swenne I. Pancreatic Beta-cell growth and diabetes mellitus. *Diabetologia* 35: 193-201. (1992)

Tarrés M. C., Montenegro S. M., Martínez S. M., Picena J. C., Toniolo M. F., Figueroa, Naves, A. The eSMT rat: a murine model of type 2 human diabetes. *Proceedings of the International Joint Meeting XII ICLAS General Assembly & Conference 7th FELASA Symposium*. JA Tur & JM Orellana (Managing editors) Laboratory Animals Ltd: London. pp. 93-94: (2000)

Teitelman G., Alpert S., Polak J. M., Martinez A. , and Hanahan D. Precursor cells of mouse endocrine pancreas coexpress insulin: glucagon and the neuronal proteins tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y: but not pancreatic polypeptide. *Development* 118: 1031-1039. (1993)

Terman A. and Brunk U. Lipofuscin: Mechanisms of formation and increase with age. *APMIS* 106: 265-276. (1998)

Thompson C. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462. (1995)

Thompson E. B. Special Topic: Apoptosis. *Annu Rev Physiol* 60: 525-532. (1998)

Thompson E. B. Mechanisms of T-cell apoptosis induced by gluco-corticoids. *Trends Endocrinol Metab* 10 (Nº 9): 353-358. (1999)

Timiras P. S. Definitions: evolution and theories. In: Hormones and Aging. P. Timiras: W. Quay: A. Vernadakis. Eds. CRC Press: Boca Raton. (1995)

Unger R. H. How obesity causes diabetes in Zucker diabetic fatty rats. *Trends Endocrinol Metab* 8(7): 276-282. (1997)

Unger R. H. and Orci L. Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J* 15: 312-321. (2001)

Unger R. H. and Orci L. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1585: 202- 212. (2002)

Unger R. H., Zhou Y-T. Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. *Diabetes* 50 (S1) S118- S121. (2001)

Unger R. H., Zhou Y-T., and Orci L. Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America* 96: 2327-2332. (1999)

Vamecq J. and Latruffe N. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their implicatios in deseases. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 7: 8 -18. (2000)

Verstak B., Hertzog P., Mansell A. Toll-like receptor signalling and the clinical benefi ts that lie within. *Inflamm. res.* 56: 1–10. (2007)

Vijg J. and Gossen J. A. Somatic mutations and cellular aging. *Comp Biochem Physiol* 104B: 429-437. (1993)

Vijg J. Impact of genome instability on transcription regulation of aging and senescence. *Mech Ageing Dev* 125: 747-753. (2004)

Virkamäki A., Kohjiro U., and Kahn C. R. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 103: 931-943. (1999).

Vlassara H. and Rashelle Palace M. Glycoxidation. The menace of diabetes and aging. *The Mount Sinai Journal Of Medicine* 70: 232-241. (2003)

Walford R.L. Immunologic theory of ageing: Current status. *Fed Proc* 3: 2020-2027: (1974)

Wallace D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482-1488. (1999)

Wang J. L., Corbett J. A., Marshall C. A., McDaniel M. L. Glucose-induced insulin secretion from purified B-Cells. *J Bio Chem* 268 (11): 7785-7791. (1993)

Weir G. C., Bonner-Weir S. Five stages of evolving B-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 53: Suppl. 3: s16-s21. (2004)

Weir G. C., Laybutt D. R., Kaneto H, Bonner-Weir S., and Sharma A. B-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes* 50: Suppl. 1: s154-s159. (2001)

Wing R. R., Blair E. H., Bononi P., Marcus M. D., Watanabe R., Bergman R. N. Caloric restriction per se is a significant factor in improvements in glycemic control and insulin sensitivity during weight loss in obese NIDDM patients. *Diabetes Care* (1): 30-6. (1994)

Xu G., Stoffers D. A., Habener J. F., Bonner-Weir S. Exendin-4 stimulates both B-cell replication and neogenesis: resulting in increased B-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48: 2270-2276. (1999)

Yamaoka T. and Itakura M. Development of pancreatic islets (Review). *Int J Mol Med* 3: 247-261. (1999)

Yoshikawa H., Kihara Y., Taguchi M., Yamaguchi T., Nakamura H., and Otsuki M. Role of TGF- α 1 in the development of pancreatic fibrosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G549-G558. (2002)

Zhou Y.-T., Grayburn P., Karim A., Shimabukuro M., Higa M., Baetens D., Orci L., Unger R. H., Lipotoxic heart disease in obese rats. Implications for human obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1784 – 1789. (2000)

Zhu M., Noma Y., Mizuno A., Sano T., Shima K. Poor capacity for proliferation of pancreatic beta-cells in Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty rat: a model of spontaneous NIDDM. *Diabetes* 45: 941-946. (1996)