



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

Géraldine Joanny Ordóñez

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

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

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

UNIVERSITAT DE BARCELONA
Facultat de Medicina
Departament de Ciències Clíniques

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

Géraldine Joanny Ordóñez

2011

Programa: Fisiología

Bienio: 2006-2008

Directores: Eduard Montanya y Noèlia Téllez

Resultados

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

Se realizó una pancreatectomía del 95% a ratas Hsd:Sprague Dawley y se les administró el análogo NN0027 o el vehículo con el objetivo de determinar la acción del análogo sobre las células beta endógenas.

1.1 Evolución Metabólica

Con el objetivo de determinar el efecto de la administración del análogo de GLP-1 NN0027 sobre la evolución metabólica de ratas pancreatectomizadas se monitorizaron el peso corporal y la glucosa sanguínea a lo largo del estudio (Figura 1A y B).

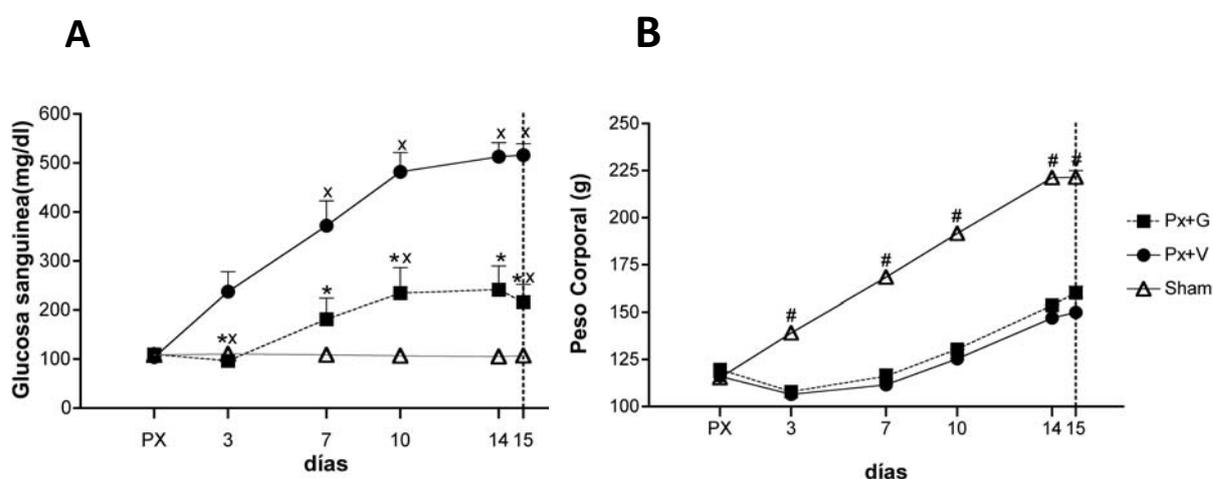


Figura 1: Evolución metabólica de las ratas pancreatectomizadas. A. Glucemia de las ratas Px tratadas con el análogo del GLP-1 (■, Px+G n=5), ratas tratadas con el vehículo (●, Px+V; n=6), y de las ratas con cirugía control no tratadas (△, Sham, n=7). Los valores son las medias \pm error estándar Kruskal-Wallis $p < 0,05$ * $p < 0,05$ vs Px+V y $\times p < 0,05$ vs Sham para el test de Mann-Whitney (M-N) y **B. Peso corporal** de las ratas Px tratadas con el análogo del GLP-1 (■, Px+G n=5), ratas tratadas con el vehículo (●, Px+V; n=6), y de las ratas con cirugía control no tratadas (△, Sham, n=7). Los valores son las medias \pm error estándar. ANOVA $p < 0,05$ y # $p < 0,05$ vs todos los demás grupos para el test DMS.

Todos los animales partieron de una misma situación metabólica antes de la cirugía control o de la pancreatectomía. Eran todas ratas jóvenes, de aproximadamente 5 semanas de edad, en situación de normoglucemia. No se encontraron diferencias en la glucosa sanguínea del día de la pancreatectomía o de la operación control (Sham) entre los grupos (Sham: $110 \pm 2,8$ mg/dL ; Px+V: $104 \pm 10,6$ mg/dL ; Px+G: $108 \pm 6,6$ mg/dL; $p = ns$).

Resultados: 1. Pancreatectomía y GLP-1

Como era de esperar, los animales con la operación control o Sham, a los que solamente se les manipulaba suavemente el páncreas, se mantuvieron normoglucémicos a lo largo de todo el estudio. En cambio, las ratas pancreatectomizadas tratadas con el vehículo desarrollaron rápidamente hiperglucemia que llegó a superar los 500 mg/dL de glucosa en sangre (día 15: 516 ± 41 mg/dL). Sin embargo, la administración diaria del análogo del GLP-1 evitó la progresión de la hiperglucemia y la glucosa sanguínea media de estos animales se mantuvo siempre por debajo de 250 mg/dl (día 14: 242 ± 48 mg/dL). A partir del día 3 después de la cirugía y hasta el final del estudio, la glucemia de los animales inyectados con el NN0027 fue más baja que la de las ratas Px tratadas con el vehículo ($p < 0.05$).

La administración de análogos del GLP-1 puede causar efectos anorexígenos tanto en modelos animales como en humanos (Larsen, Fledelius et al. 2001; Astrup, Rössner et al. 2009). Para excluir que la mejora en el control glucémico fuera debida a una ingesta reducida de alimentos y por lo tanto a un menor requerimiento de insulina la evolución del peso corporal fue comparada entre los grupos (Figura 1B). Las ratas pancreatectomizadas tratadas con el análogo NN0027 o con el vehículo exhibieron un aumento muy similar del peso corporal durante el estudio. Las ratas no pancreatectomizadas (sham) presentaron mayor peso desde el día 3 después de la cirugía ($p < 0.05$).

1.2 Replicación de las células beta

La replicación de las células beta se determinó por incorporación de BrdU en los remanentes pancreáticos extraídos 15 días después de la cirugía. La proliferación de las células marcadas por insulina aumentó un 40% tras la pancreatectomía subtotal (Figura 2) pero las diferencias no alcanzaron la significación estadística (Px+V: $1,02 \pm 0,20$ vs Sham: $0,72 \pm 0,18$; $p = ns$). Sin embargo, la administración del análogo del GLP-1 aumentó la replicación de las células beta en un 200% en comparación con la de los animales con operación control y fue significativamente mayor a la de los remanentes pancreáticos de Px+V y a la del páncreas de los animales sham con operación control (Px+G: $1,64 \pm 0,17$; $p < 0,05$).

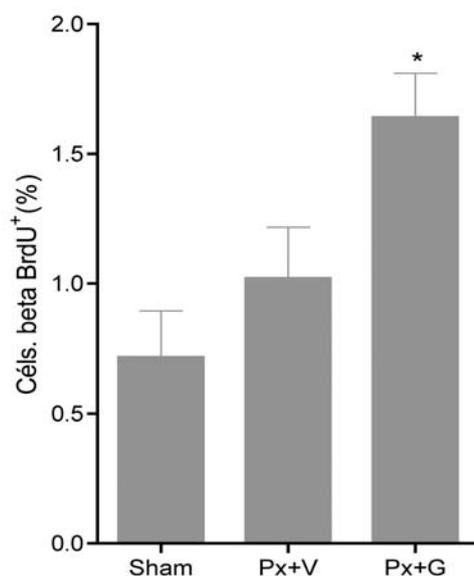


Figura 2: Replicación de las células beta de los remanentes pancreáticos de ratas Sham (n=5) o Px tratadas con vehículo (Px+V; n= 6) o con el análogo del GLP-1 (Px+ G; n=4). Los valores corresponden a la media \pm error estándar. ANOVA $p < 0,05$ * $p < 0,05$ vs todos los demás grupos para el test DMS.

1.3 Neogénesis de células beta

La neogénesis se determinó a través de dos métodos indirectos. Se determinó el número de pequeñas agrupaciones (menos de cinco células) de células beta extrainsulares, como un indicador de la cantidad de células beta formadas recientemente, y de forma complementaria el porcentaje de de islotes en contacto o muy próximos (menos de cinco células de distancia) a los ductos pancreáticos como una indicación de haber brotado de ellos recientemente.

Se determinó el número de pequeñas agrupaciones de menos de cinco células insulina positivas existentes por milímetro cuadrado de tejido (Figura 3A). El número de células beta formando agrupaciones aisladas tendió a estar aumentado en los remanentes pancreáticos de las ratas Px inyectadas con vehículo en comparación con las ratas sham ($0,27 \pm 0,08$ vs $0,11 \pm 0,03$ agrupaciones/ mm^2 ; $p = \text{ns}$). Esta cifra prácticamente se cuadruplicó en los remanentes de los animales tratados con el análogo del GLP-1 NN0027 ($0,45 \pm 0,11$ agrupaciones/ mm^2) en comparación con los animales con operación control ($p < 0,05$).

Se determinó la proximidad de los islotes a los ductos contando la distancia (en células) existente entre el islote y el ducto más próximo. Cuando el islote se encontraba dentro del ducto o a menos de cinco células de distancia de este se consideró que el islote era periductal. El porcentaje de

Resultados: 1. Pancreatectomía y GLP-1

islotos periductales (Figura 3B) fue mayor en las ratas pancreatectomizadas que en las ratas sham (Px+V: $94,6 \pm 3,31$ vs Sham: $47,2 \pm 0,77\%$; $p < 0,01$) sugiriendo que la neogénesis aumentó después de la pancreatectomía del 95%. En los animales tratados con NN0027 el porcentaje de islotos periductales siguió siendo superior al del grupo Sham (Px+G: $76,7 \pm 4,92$; $p < 0,01$) aunque menor al del grupo Px+V ($p < 0,05$).

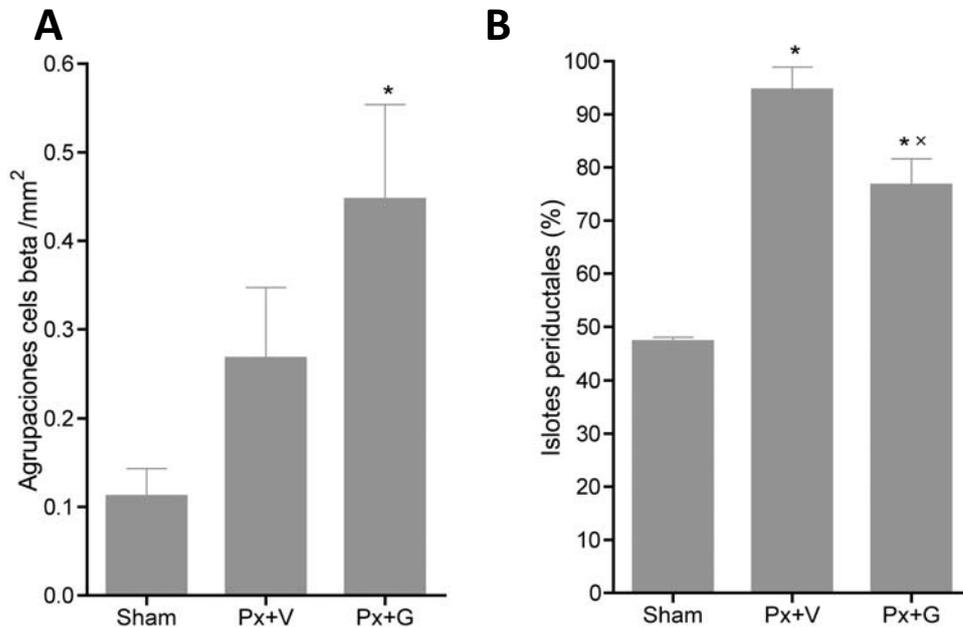


Figura 3: Neogénesis de células beta. (A) Agrupaciones de células beta extrainsulares en los remanentes pancreáticos de ratas Sham (n=3) o Px tratadas con Vehículo (n= 6) o con el análogo del GLP-1 (n=5).

(B) Porcentaje de islotos periductales en los remanentes pancreáticos de ratas Sham (n=6) o Px tratadas con Vehículo (n= 5) o con el análogo del GLP-1 (n=5). Los valores corresponden a la media \pm error estándar. ANOVA $p < 0,05$ * $p < 0,05$ respecto a sham y x $p < 0,05$ respecto a Px+V para el test DMS.

1.4 Apoptosis de las células beta

La proporción de células beta que mueren por apoptosis se determinó por la técnica del TUNEL en los remanentes pancreáticos quince días después de la pancreatectomía (Figura 4). No se encontraron diferencias estadísticas en la apoptosis de células beta entre los tres grupos estudiados (Px+G: $0,12 \pm 0,01\%$; Px+V: $0,15 \pm 0,04$ y Sham: $0,08 \pm 0,02\%$; $p = ns$).

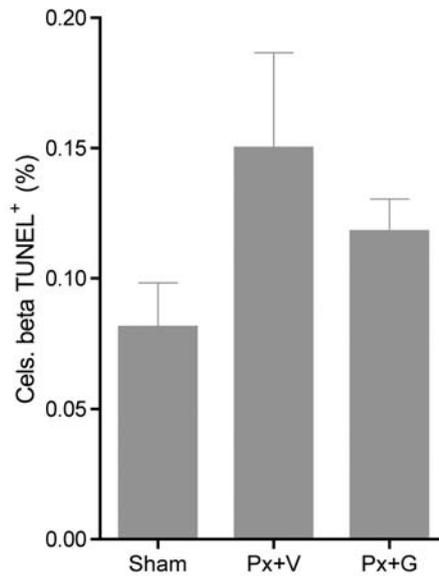


Figura 4: Apoptosis de células beta en los remanentes pancreáticos de ratas Sham (n=7) o Px tratadas con Vehículo (n= 6) o con el análogo del GLP-1 (n=5). Los valores corresponden a la media \pm error estándar.

1.5 Tamaño de las células beta

El tamaño individual de las células beta de los animales pancreatectomizados (Px+G: $260 \pm 14,3 \mu\text{m}^2$; Px+V: $251 \pm 24,2 \mu\text{m}^2$) fue mayor que el del grupo sham ($197 \pm 15,7 \mu\text{m}^2$), pero la diferencia era estadísticamente significativa tan solo en el caso de los animales pancreatectomizados tratados con NN0027 ($p < 0.05$) (Figura 5).

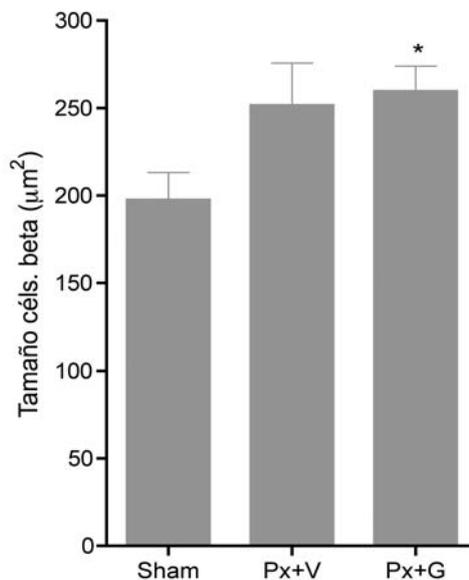


Figura 5: Tamaño de las células beta de los remanentes pancreáticos de ratas Sham (n=5) o Px tratadas con Vehículo (Px+V; n= 6) o con el análogo del GLP-1 (Px+G; n=5). Los valores corresponden a la media \pm error estándar. ANOVA $p < 0.05$. * $p < 0,05$ respecto a Sham para el test DMS

Resultados: 1. Pancreatectomía y GLP-1

1.6 Masa de células beta

Se determinó la masa de células beta en los remanentes tras la pancreatectomía o en la parte equivalente de los páncreas de los animales sham (Figura 6).

La administración del análogo de GLP-1 NN0027 a ratas pancreatectomizadas duplicó la masa de células beta en comparación con la masa beta de los páncreas tratados con vehículo ($0,90 \pm 0,07$ mg vs $0,46 \pm 0,12$ mg; $p < 0,05$). La masa beta en los animales Px+G era tres veces mayor que la de los animales sham ($0,36 \pm 0,07$ mg) ($p < 0,01$).

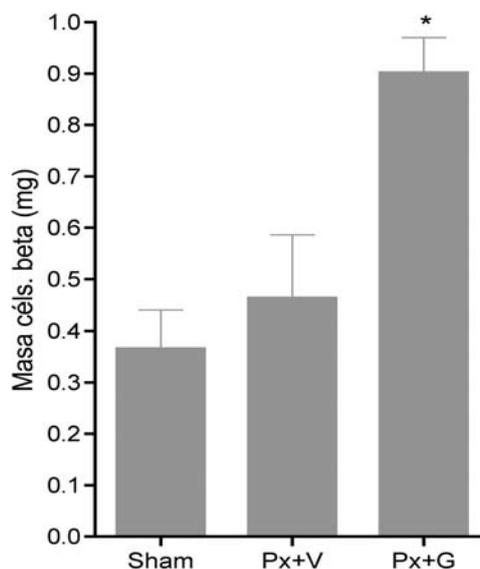


Figura 6: Masa de células beta en los remanentes pancreáticos de ratas Sham (n=5) o Px tratadas con Vehículo (n= 6) o con el análogo del GLP-1 (n=5). Los valores corresponden a la media \pm error estándar. ANOVA $p < 0,05$. * $p < 0,05$ vs todos los demás grupos por el test DMS.

1.7 Vascularización de los islotes

Teniendo en cuenta que el GLP-1 puede tener acciones sobre el endotelio (Yu, Moreno et al. 2003), que la angiogénesis puede influenciar el proceso de neogénesis (Johansson, Andersson et al. 2006) y que las células endoteliales pueden promover la replicación de las células beta (Johansson, Mattsson et al. 2006), se midió la vascularización de los islotes de los remanentes pancreáticos como parámetro complementario (Figura 7).

La vascularización se determinó mediante inmunohistoquímica y se analizaron diferentes aspectos para obtener una información más completa sobre las características de los vasos de los

islotes de los remanentes pancreáticos. Se determinó tanto el número de vasos del tejido insular como el tamaño de éstos y el área insular del tejido. A partir de estos datos se infirió la densidad vascular, el tamaño medio de los vasos y el número de vasos por área de tejido insular.

En el caso de los animales sham y de los pancreatectomizados inyectados con el vehículo el porcentaje de tejido insular ocupado por vasos sanguíneos o densidad vascular era similar (Sham: $4,45 \pm 0,53$ %; Px+V: $4,55 \pm 0,40$ %; $p=ns$). En las ratas Px tratadas con el análogo del GLP-1 se detectó un ligero aumento, del 20%, en la densidad vascular respecto a la de Px+Vehículo que no alcanzó significación estadística (Px+G: $5,46 \pm 0,69$; $p=0,3$ vs otros grupos).

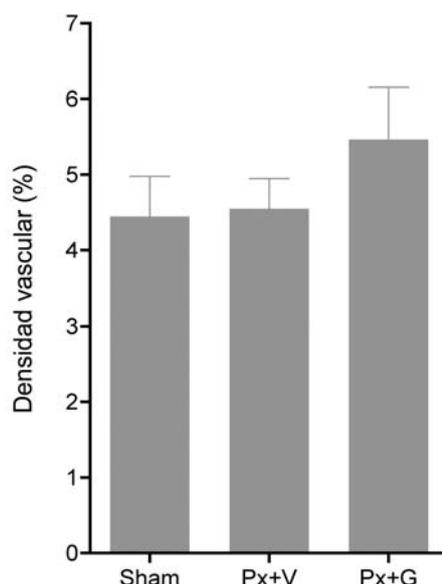


Figura 7: Densidad vascular de los islotes de los remanentes pancreáticos de ratas sham ($n=4$) o de ratas Px tratadas con vehículo ($n=6$) o con el análogo del GLP-1 ($n=5$). Los valores corresponden a la media \pm error estándar.

El tamaño medio de los vasos se calculó dividiendo el área total vascular por el número de vasos contabilizados (Figura 8A). La pancreatectomía no tuvo efecto sobre el tamaño de los vasos ya que fue muy similar entre los vasos de los páncreas de las ratas sham y los vasos de los remanentes de las ratas tratadas con el vehículo (Sham: $35,8 \pm 7,00 \mu\text{m}^2$ vs Px+V: $32,6 \pm 4,18 \mu\text{m}^2$; $p=ns$). De forma similar a lo que ocurría con la densidad vascular, en las ratas Px tratadas con NN0027 se observó un incremento en el tamaño medio de los vasos sanguíneos insulares no estadísticamente significativo (Px+G: $44,7 \pm 5,09 \mu\text{m}^2$; $p=ns$ vs otros grupos).

Finalmente, como última aproximación a la vascularización de los islotes en nuestro estudio se calculó el número de vasos por milímetro cuadrado de tejido insular (Figura 8B). No se detectaron

Resultados: 1. Pancreatectomía y GLP-1

diferencias entre los tres grupos estudiados (Sham: 1296 ± 112 vasos /mm² islote vs Px+V: 1470 ± 138 vasos /mm² islote vs Px+G: $1217 \pm 57,8$ vasos /mm² islote; p=ns)

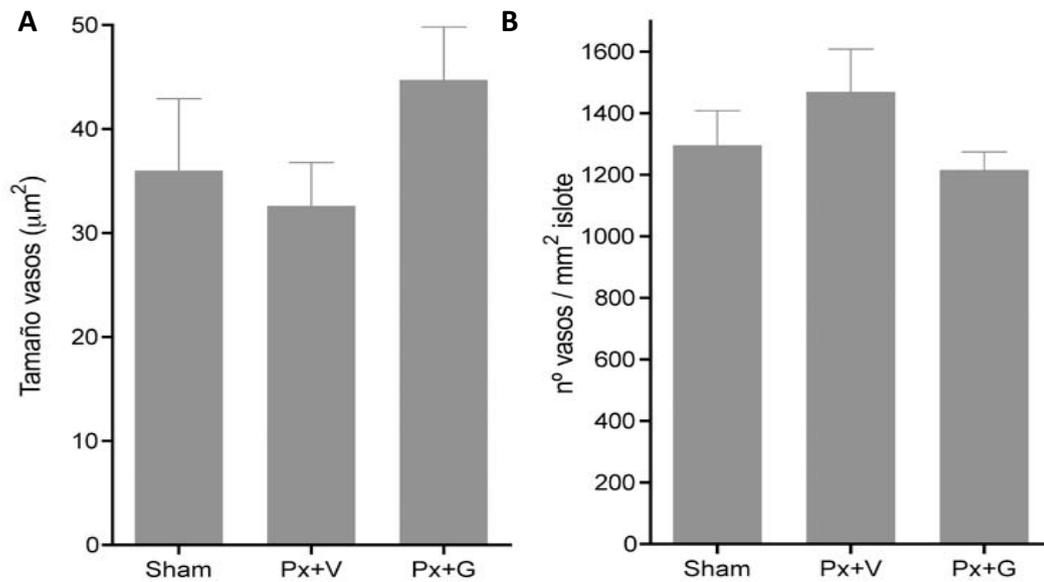


Figura 8: Vascularización de los islotes A. Tamaño medio de los vasos y **B.** n^o de vasos/mm² de islote de los remanentes pancreáticos de ratas sham (n= 4) o de ratas Px tratadas con vehículo (n=6) o con el análogo del GLP-1 (n=5). Los valores corresponden a la media \pm error estándar.

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

Se transplantaron 800 islotes a ratas diabéticas o normoglucémicas para evaluar los efectos a medio plazo (14 días) de la administración de NN0027 sobre las células beta transplantadas. Esta parte del estudio tenía como objetivo determinar si la acción del análogo del GLP-1 requiere hiperglucemia.

2.1 Evolución metabólica

2.1.1 Evolución metabólica de los animales diabéticos transplantados

Se transplantó una masa de 800 islotes, insuficiente pero cercana a la necesaria para restaurar la normoglucemia en ratas diabéticas por STZ, para determinar la capacidad del NN0027 para mejorar el pronóstico del transplante.

La glucemia de los animales diabéticos transplantados se monitorizó los días 3, 7, 10 y 14 después del transplante (Figura 9). Como era de esperar, los animales del grupo control -diabéticos por STZ pero no transplantados- inyectados con el análogo de GLP-1 NN0027 o con vehículo, se mantuvieron hiperglucémicos a lo largo de todo el estudio y no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Esto sugirió que después de la inyección con STZ no quedó tejido beta en el páncreas endógeno sobre el que el análogo del GLP-1 pudiera tener algún efecto y que condicionara la evolución metabólica de los animales transplantados y tratados, y que por tanto los efectos que se detectasen en los animales diabéticos transplantados y tratados con el análogo del GLP-1 se deberían a la acción de este sobre los islotes transplantados.

La glucemia de los animales diabéticos transplantados y tratados con el análogo del GLP-1 se redujo tras el transplante y fue significativamente menor que la de los dos grupos no transplantados ya a partir del día 3 después del transplante y hasta el día 14 en que se extrajo el injerto (Figura 9). Además, a día 14, cinco de los 18 (28%) animales transplantados y tratados con NN0027 habían alcanzado la normoglucemia. En los animales transplantados y tratados con vehículo, la glucemia mostró una menor reducción tras el transplante, que tan solo alcanzó significación estadística los días 7 y 10 respecto a los dos grupos de animales no transplantados (Figura 9). De los quince animales transplantados tratados con vehículo solamente uno (7%) consiguió restablecer la normoglucemia. Aunque la glucemia de las ratas transplantadas tratadas con el análogo de GLP-1 se mantuvo por debajo de la de las ratas inyectadas con vehículo, las diferencias no alcanzaron

Resultados: 2 Transplante de islotes y GLP-1 – 14 días

significación estadística. Después de la extracción del injerto todos los animales revirtieron al estado hiperglucémico anterior al transplante, con valores de más de 500mg/dL, indicando que la disminución en la glucemia que se detectó fue debida al injerto y no a regeneración del páncreas endógeno.

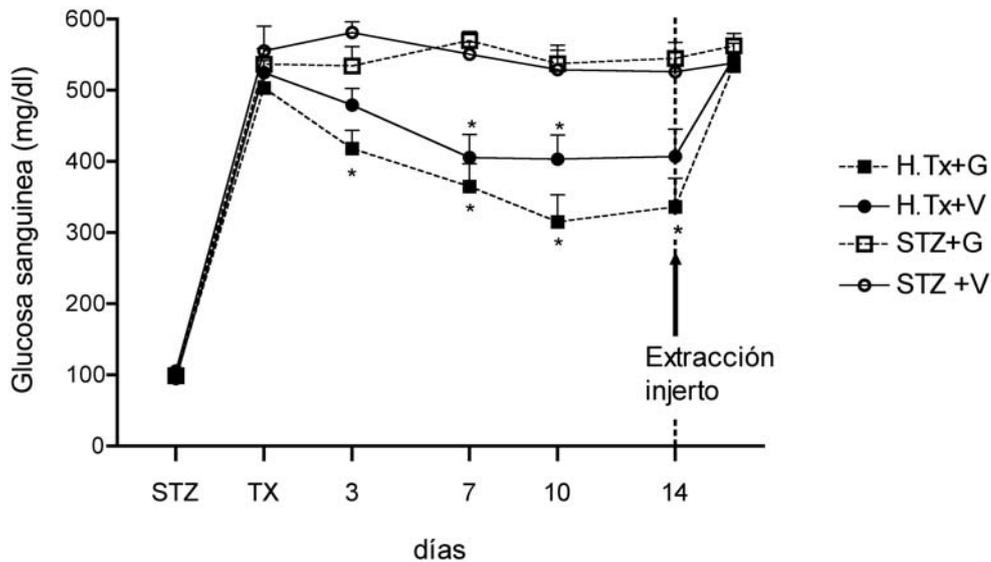


Figura 9: Glucemias de las ratas diabéticas por STZ transplantadas con 800 islotes y tratadas durante 14 días con el análogo del GLP-1 (■, H.Tx+G; n=18) o con el vehículo (●, H.Tx+V; n=15) o no transplantadas y tratadas durante 14 días con el análogo del GLP-1 (□, STZ+G; n=11) o con el vehículo (○, STZ+V; n=8). Los valores corresponden a la media ± error estándar. ANOVA $p < 0,05$ * $p < 0,05$ vs los dos grupos de no transplantados (diferente tanto de STZ+G como de STZ+V) para el test DMS.

En el grupo de las ratas transplantadas tratadas con el análogo del GLP-1 NN0027 ocho animales (44%) presentaban función del injerto (glucemia inferior a 360mg/dl) (Figura 10) mientras que solo el 27% de las transplantadas inyectadas con vehículo lo hacen. Ninguno de los animales no transplantados presentó una glucemia inferior a 360mg/dL en ningún momento. Los datos combinados de función de parcial y de curación de cada uno de los grupos fueron comparados sin detectar diferencias significativas entre H.Tx+V y H.Tx+G.

Resultados: 2. Transplante de islotes y GLP-1 – 14 días

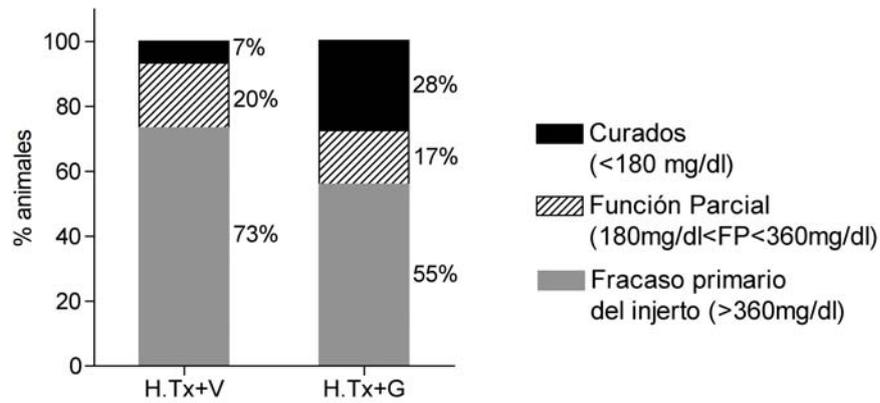


Figura 10: Distribución de curados y con función parcial del injerto de las ratas diabéticas por STZ transplantadas con 800 islotes y tratadas durante 14 días con el vehículo (H.Tx+V; n=15) con el análogo del GLP-1 (H.Tx+G; n=18). Los valores corresponden al porcentaje de animales con una glucemia en el rango determinado en cada uno de los grupos

Finalmente se estudió también el momento en el que se detectó función del injerto. Para ello se definió el tiempo para alcanzar la función del injerto como los días transcurridos desde el trasplante hasta el primer día en que la glucemia de la rata transplantada alcanzaba valores inferiores a 360 mg/dl. Con este valor de tiempo se trazó la curva de supervivencia (Figura 11).

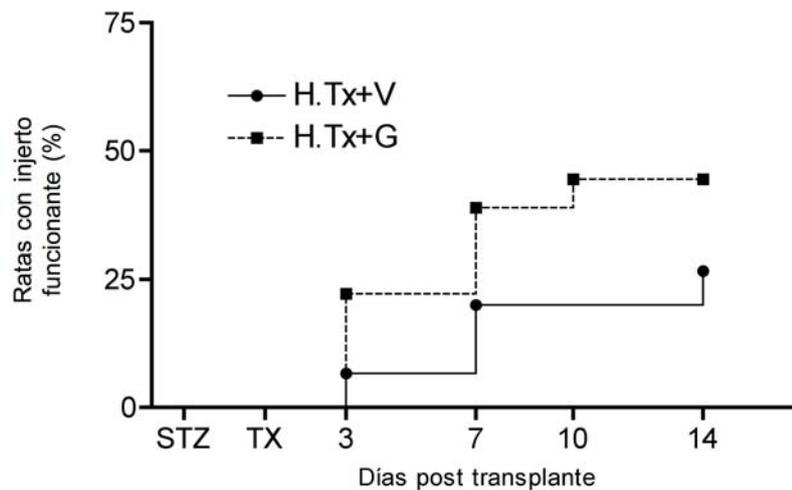


Figura 11: Función del injerto de las ratas diabéticas por STZ transplantadas con 800 islotes y tratadas durante 14 días con el análogo del GLP-1 (■, H.Tx+G; n=18) o con el vehículo (●, H.Tx+V; n=15). Los valores corresponden al porcentaje de animales de cada grupo que presentan una glucemia inferior a 360 mg/dl en un momento dado.

El tiempo medio para alcanzar la función parcial fue de $5,37 \pm 0,96$ días para las ratas transplantadas tratadas con NN0027 y de $7,75 \pm 2,29$ días para las Tx inyectadas con el vehículo. El

Resultados: 2 Trasplante de islotes y GLP-1 – 14 días

análisis de supervivencia de los datos no mostró diferencias estadísticamente significativas (Figura 11).

Las concentraciones de insulina plasmática también fueron determinadas en el seguimiento de los animales después del trasplante de islotes. Como era de esperar la insulinemia aumentó después del trasplante en comparación con los animales no transplantados (STZ+V y STZ+G) en los que los niveles de insulina se mantuvieron muy bajos a lo largo del estudio. (Figura 12A)

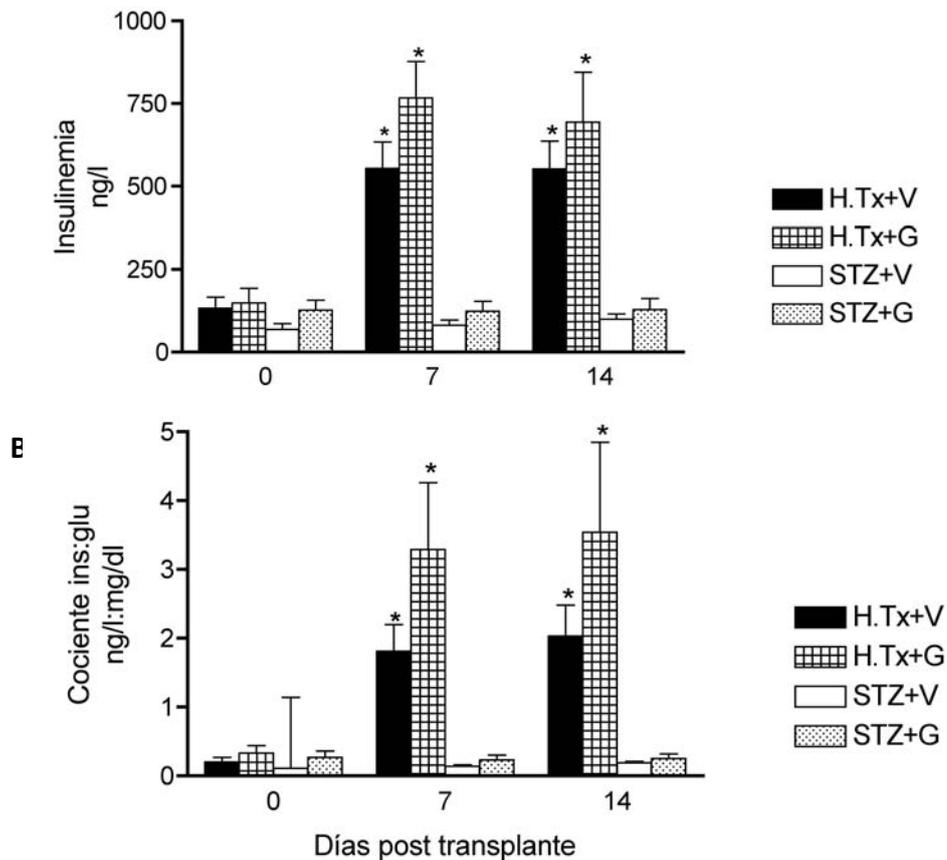


Figura 12: Insulinemia (A) y Cociente insulina/glucosa (B) de las ratas diabéticas por STZ transplantadas con 800 islotes (H.Tx) y tratadas durante 14 días con el vehículo (■) (día 0 n=7, día 7 n= 12, día 14 n=11), con el análogo del GLP-1 (▣) (día 0 n=9, día 7 n= 12, día 14 n=13) o no transplantadas (STZ) y tratadas durante 14 días con el vehículo (□) (día 0 n=4, día 7 n= 4, día 14 n=4) o con el análogo del GLP-1 (▢) (día 0 n=6, día 7 n= 8, día 14 n=8). Los valores corresponden a la media \pm error estándar. Kruskal-Wallis $p < 0,01$ * $p < 0,01$ vs el día 0 del mismo grupo para el test de Mann-Whitney

Entre los grupos de transplantados (Figura 12 A) había una tendencia a valores más elevados en los animales tratados con el análogo del GLP-1 NN0027. Se calculó el cociente insulina (nmol/l)/glucosa (mg/l) y se observó que también tendía a ser mayor en las ratas Tx inyectadas con el análogo del GLP-1 que en las que lo estaban con vehículo (día 14, H.Tx+V: $0,35 \pm 0,08$ y H.Tx+G: $0,62 \pm 0,23$; $p = ns$) (Figura 12 B).

Como ya se ha comentado, el tratamiento con análogos del GLP-1 puede tener efectos anorexígenos por lo que se quiso averiguar si la mejora en el control metabólico podía atribuirse a una reducción en la ingesta de comida y a un menor peso corporal. La ganancia de peso a lo largo del estudio fue muy similar entre los dos grupos de animales transplantados tratados con el análogo del GLP-1 o con vehículo (Figura 13).

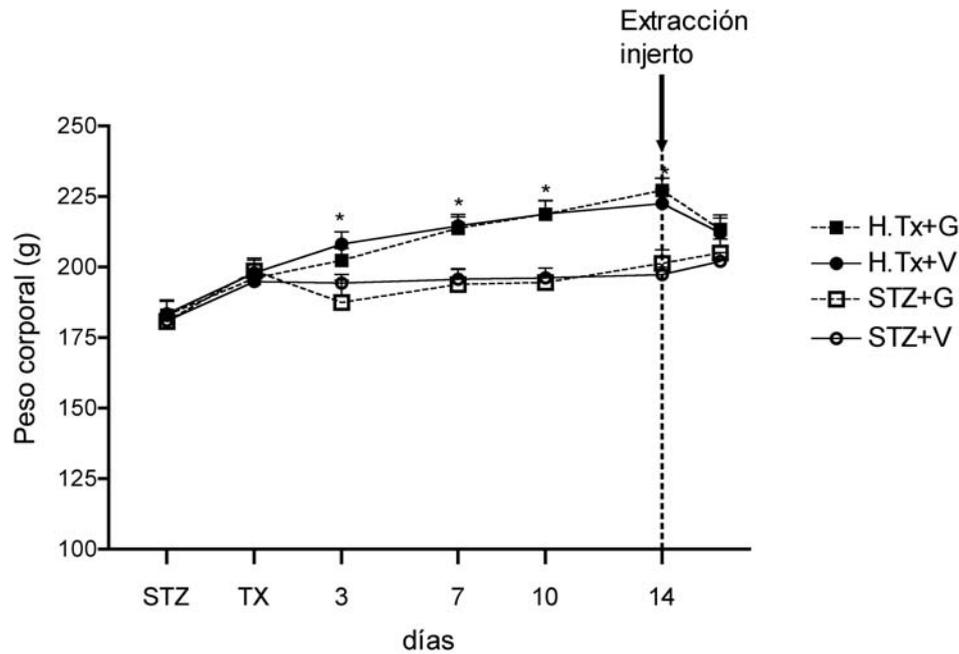


Figura 13: Peso corporal de las ratas diabéticas por STZ transplantadas con 800 islotes y tratadas durante 14 días con el análogo del GLP-1 (■; n=18) o con el vehículo (●; n=15) o no transplantadas y tratadas durante 14 días con el análogo del GLP-1 (□; n=11) o con el vehículo (○; n=8). Los valores corresponden a la media \pm error estándar. ANOVA $p < 0,05$ * $p < 0,05$ vs STZ+G para el test DMS.

2.1.2 Evolución metabólica de los animales normoglucémicos transplantados

La glucemia (Figura 14A) de los animales normoglucémicos transplantados y tratados con el análogo del GLP-1 o con vehículo se mantuvo estable dentro de la normalidad a lo largo del tiempo y fue muy similar entre los dos grupos en todos los tiempos de estudio (día 14 N.Tx+V : $92,3 \pm 3,47$

Resultados: 2 Transplante de islotes y GLP-1 – 14 días

mg/dL vs N.Tx+G: $92,2 \pm 3,77$; $p=ns$). En ningún caso el transplante o el tratamiento con NN0027 fueron causantes de hipoglucemia.

Asimismo, el peso corporal (Figura 14B) de las ratas normoglucémicas transplantadas aumentó de forma gradual a lo largo de los días y los dos grupos presentaron una evolución muy similar (día 14 N.Tx+V : $242 \pm 7,0$ g vs N.Tx+G: $247 \pm 8,5$ g ; $p=ns$).

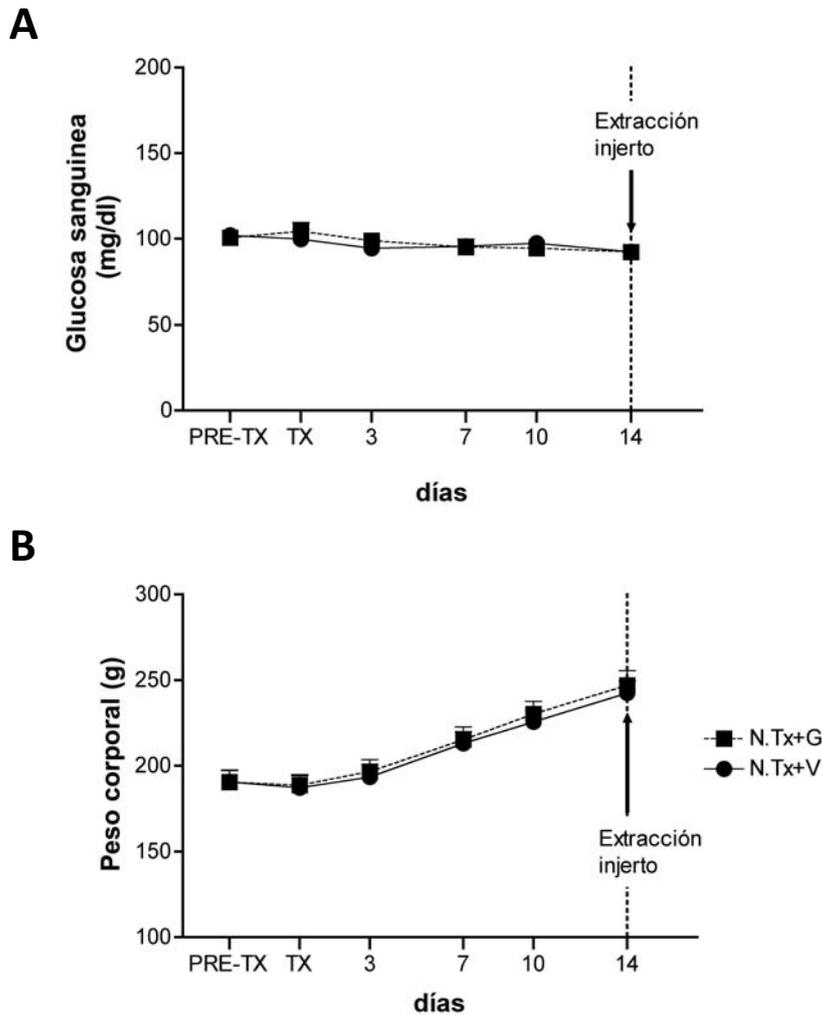


Figura 14: Evolución metabólica A. Glucemia de las ratas normoglucémicas transplantadas con 800 islotes tratadas con vehículo (N.Tx+V; n=7) o con el análogo del GLP-1 (N.Tx+G; n=8) **B. Peso corporal** de las ratas normoglucémicas transplantadas con 800 islotes tratadas con vehículo (N.Tx+V; n=7) o con el análogo del GLP-1 (N.Tx+G; n=8). Los valores corresponden a la media \pm error estándar.

2.2 Replicación de las células beta

Se comparó la replicación de las células beta en los injertos de los receptores hiperglucémicos con la replicación en los injertos de animales normoglucémicos.

La replicación de las células beta en los injertos de los receptores hiperglucémicos (Figura 15A) se encontró aumentada 14 días después del transplante en comparación con la replicación en el páncreas normal (H.Tx+V: $0,50 \pm 0,08\%$ vs Páncreas: $0,26 \pm 0,05\%$; $p < 0,05$). La replicación beta de los animales tratados con el análogo del GLP-1 NN0027 triplicaba la de los páncreas normales ($p < 0,05$) y era un 60% superior a la de los H.Tx+V, (H.Tx+G: $0,72 \pm 0,19\%$) aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0,25$).

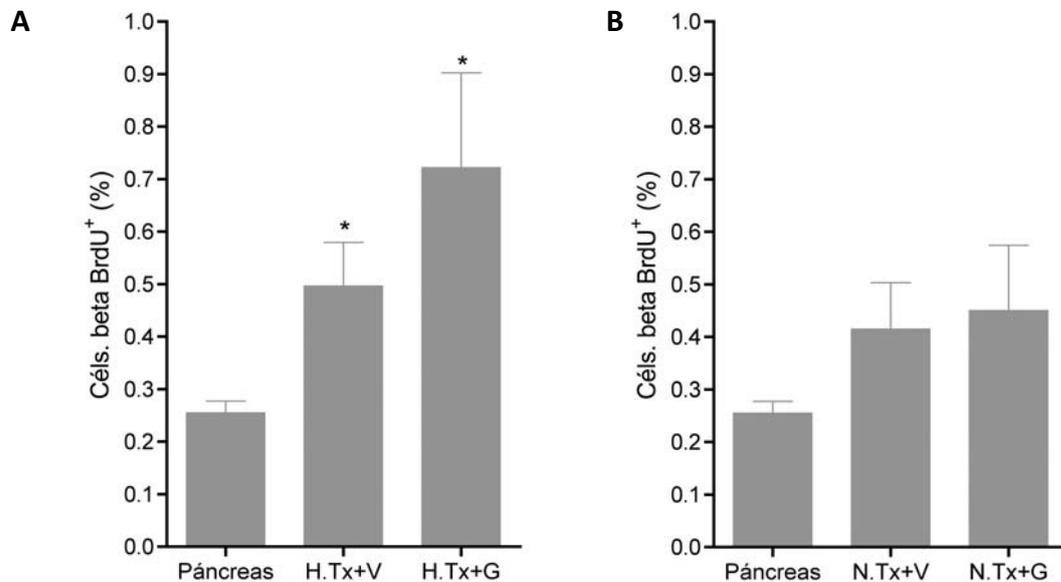


Figura 15: Proliferación de las células beta de páncreas control (Páncreas; n=4) ; **(A)** de los injertos 800 islotes a ratas diabéticas por STZ tratadas con vehículo (H.Tx+V; n=8) o con el análogo del GLP-1 (H.Tx+G; n=7) y **(B)** de los injertos 800 islotes a ratas normoglucémicas tratadas con vehículo (N.Tx+V; n=5) o con el análogo del GLP-1 (N.Tx+G; n=5). Los valores corresponden a la media \pm error estándar. * $p < 0,05$ vs páncreas con el test T con la corrección de Welch.

En cambio, como era de esperar en situación de normoglucemia, en los animales normoglucémicos que fueron transplantados la replicación de las células beta no se modificó (N.Tx+V: $0,41 \pm 0,09$) respecto al páncreas (Páncreas: $0,26 \pm 0,05\%$). Además, en situación de

Resultados: 2 Trasplante de islotes y GLP-1 – 14 días

normoglucemia el tratamiento con el análogo del GLP-1 no mostró efecto sobre la replicación (N.Tx+G: $0,45 \pm 0,12\%$) (Figura 15B).

2.3 Apoptosis de las células beta

Se comparó la apoptosis de las células beta en los injertos de los receptores hiperglucémicos con la apoptosis en los injertos de animales normoglucémicos.

La apoptosis de las células beta estaba aumentada en los injertos de islotes 14 días después del trasplante en situación de hiperglucemia (Tx+V: $0,27 \pm 0,04\%$ vs Páncreas: $0,06 \pm 0,03\%$; $p < 0,02$) y el tratamiento con el análogo del GLP-1 (H.TX+G: $0,25 \pm 0,04\%$) no fue capaz de prevenirlo (Figura 16A).

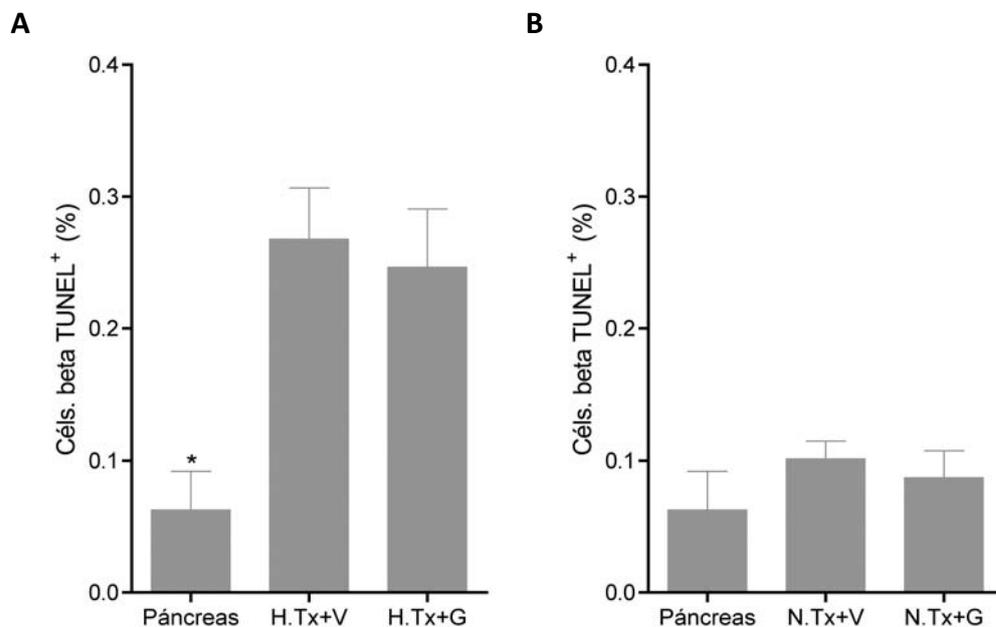


Figura 16: Apoptosis de las células beta de páncreas control (n=6); **(A)** de los injertos 800 islotes a ratas diabéticas por STZ tratadas con vehículo (Tx+V; n=8) o con el análogo del GLP-1 (Tx+G; n=8). Los valores corresponden a la media \pm error estándar. ANOVA $p < 0,05$ * $p < 0,02$ vs los demás grupos para el test DMS **(B)** Apoptosis de los injertos 800 islotes a ratas normoglucémicas tratadas con vehículo (N.Tx+V; n=7) o con el análogo del GLP-1 (N.Tx+G; n=7). Los valores corresponden a la media \pm error estándar.

En cambio, en los receptores normoglucémicos transplantados la apoptosis de las células beta no estaba incrementada 14 días después del trasplante (Páncreas $0,06 \pm 0,03\%$ vs N.Tx+V: $0,10 \pm 0,01\%$; $p = ns$); y fue similar en ambos grupos transplantados (N.Tx+G: $0,09 \pm 0,02\%$) (Figura 16B).

2.4 Masa de células beta

Finalmente, la masa de células beta 14 días después del transplante también se comparó entre receptores hiperglucémicos y normoglucémicos.

La masa de células beta era significativamente menor a la inicialmente transplantada en los injertos de los receptores tratados con vehículo (Islotes: $2,91 \pm 0,17$ mg vs H.Tx+V: $0,96 \pm 0,18$ mg; $p < 0,05$) y era igual de baja en los tratados con el NN0027 (H.Tx+G: $0,98 \pm 0,19$ mg vs islotes; $p < 0,05$) (Figura 17A).

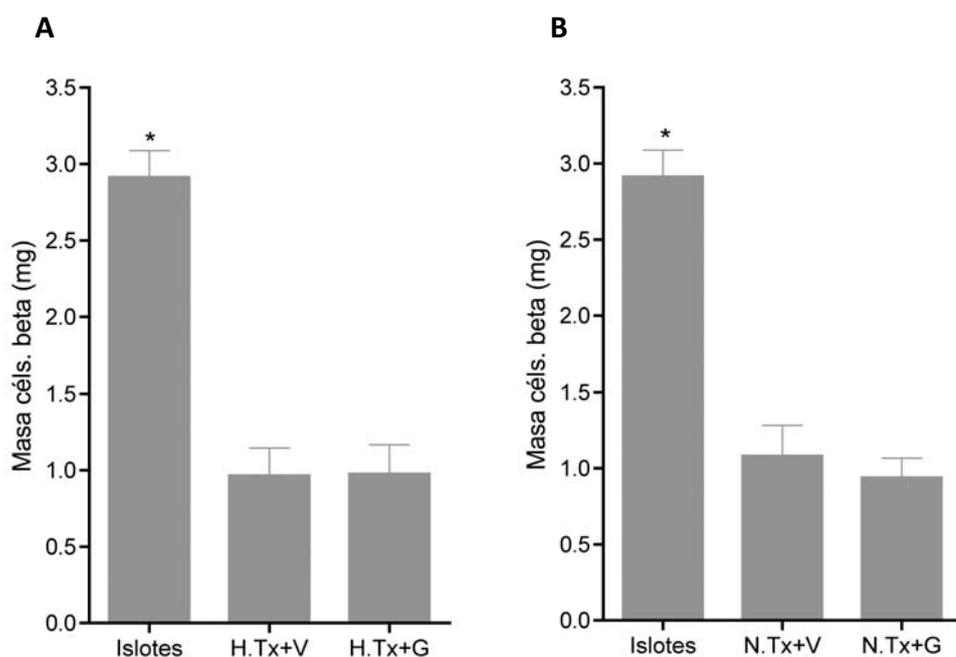


Figura 17: Masa de células beta de islotes antes del TX (n=4); **(A)** de los injertos a ratas diabéticas por STZ tratadas con vehículo (H.Tx+V; n=8) o con el análogo del GLP-1(Tx+G; n=9) y **(B)** de los injertos a ratas normoglucémicas tratadas con vehículo (N.Tx+V; n=7) o con el análogo del GLP-1 (N.Tx+G; n=7). Los valores corresponden a la media \pm error estándar. ANOVA $p < 0,01$ * $p < 0,01$ vs los demás grupos para el test DMS.

En los transplantados normoglucémicos, los resultados obtenidos son prácticamente los mismos. La masa de células beta también era significativamente menor a la inicialmente transplantada tanto en los injertos de los receptores tratados con vehículo, como en los tratados con el análogo del GLP-1 (Islotes: $2,91 \pm 0,17$ mg vs N.Tx+V: $1,08 \pm 0,20$ mg y N.Tx+G: $0,94 \pm 0,13$ mg; $p < 0,05$) (Figura 17B).

3. Estudio 3: Efectos de la administración de un análogo del GLP-1 sobre el injerto de islotes a ratas diabéticas en los días inmediatos al transplante

Para estudiar los efectos de la administración del análogo del GLP-1 sobre la supervivencia de las células beta en los primeros días del transplante, se realizó un estudio a tres días en el se transplantaron 500 islotes, que es una masa insular claramente insuficiente para restablecer la normoglucemia (Tellez, Montolio et al. 2007) con lo que los animales receptores se mantienen hiperglucémicos. Este diseño tenía como objetivo asegurar que los islotes transplantados estarían sometidos a las mismas condiciones de hiperglucemia tanto en el grupo control como en el tratado con GLP-1.

3.1 Evolución metabólica

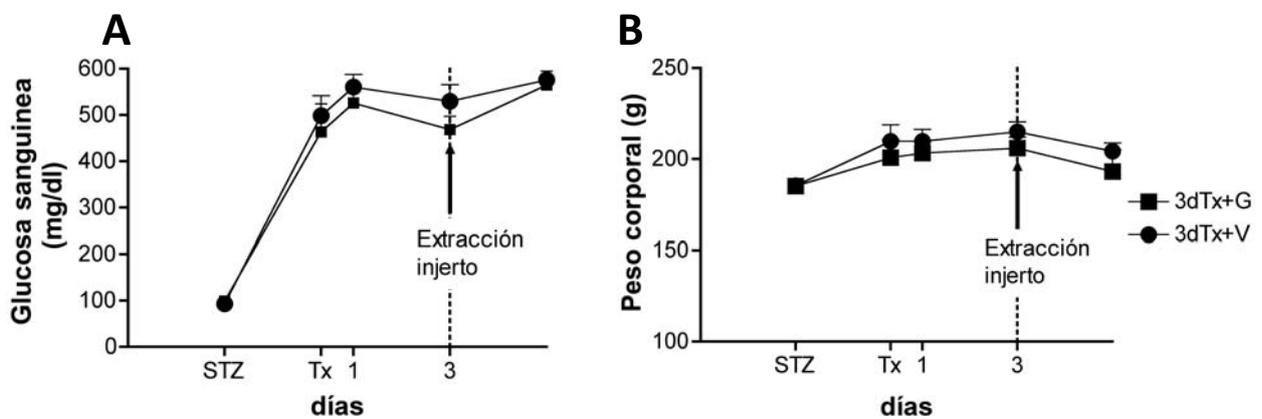


Figura 18: Evolución metabólica de las ratas diabéticas por STZ transplantadas con 500 islotes **A. Glucemias** de las ratas tratadas durante 3 días con el análogo del GLP-1 (■, 3dTx+G; n=6) o con el vehículo (●, 3dTx+V; n=6). **B. Peso corporal** de las ratas diabéticas por STZ transplantadas con 500 islotes y tratadas durante 3 días con el análogo del GLP-1 (■; n=6) o con el vehículo (●; n=6). Los valores corresponden a la media \pm error estándar.

Como se había previsto, los dos grupos de ratas transplantadas se mantuvieron altamente hiperglucémicos en los tres días siguientes al transplante (día3 3dTx+V: $469 \pm 28,3$ mg/dL y 3dTx+G: $530 \pm 36,0$ mg/dL; p=ns) (Figura 18A).

De la misma forma, el peso corporal de las ratas transplantadas se mantuvo prácticamente estable a lo largo de los tres días y no se observaron diferencias entre los dos grupos de animales (día3 3dTx+V: $215 \pm 5,4$ g y 3dTx+G: $206 \pm 6,0$ g; $p=ns$) (Figura 18B).

3.2 Replicación de las células beta

La replicación de las células beta en los injertos tres días después del transplante fue similar en ambos grupos de transplantados (3dTx+V: $0,41 \pm 0,06$ % y 3dTx+G: $0,48 \pm 0,09$ %) y en el páncreas normal (Páncreas: $0,26 \pm 0,02$ %) (Figura 19).

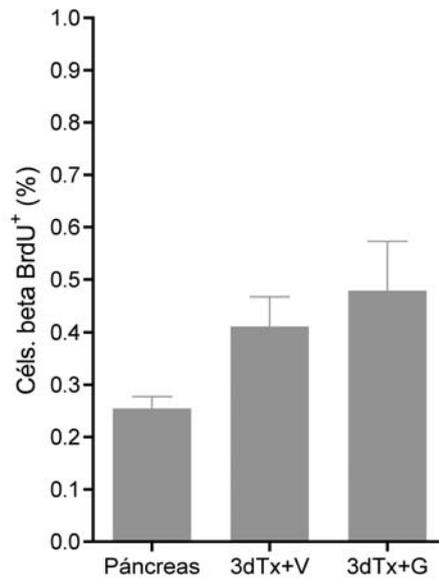


Figura 19: Replicación de las células beta en páncreas control (n=4) o en los injertos de ratas Px tratadas con vehículo (n= 6) o con el análogo de GLP-1 (n=6). Los valores corresponden a la media \pm error estándar.

3.3 Apoptosis de las células beta

La apoptosis de las células beta se encontró aumentada de forma muy importante a los tres días del transplante en el grupo control tratado con vehículo (3dTx+V: $0,57 \pm 0,15$ % vs Páncreas: $0,06 \pm 0,03$ %; $p < 0,05$) y también en los injertos de las ratas tratadas con el análogo de GLP-1 (3dTx+G: $0,51 \pm 0,08$ %) (Figura 20).

Resultados: 3. Transplante de islotes y GLP-1 – 3 días

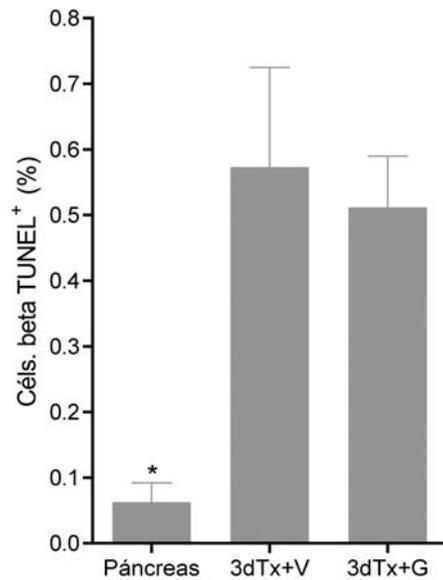


Figura 20: Apoptosis de células beta en páncreas control (n=6) o en los injertos de ratas Px tratadas con vehículo (n=6) o con el análogo de GLP-1 (n=6). Los valores corresponden a la media \pm error estándar. ANOVA $p < 0,05$ * $p < 0,02$ vs todos los demás para el test DMS.

3.4 Masa de células beta

La masa de células beta transplantadas se redujo de forma similar tres días después del transplante tanto en las ratas tratadas con NN0027 como con vehículo (Islotes frescos: $2,05 \pm 0,34$ mg vs 3dTx+V: $0,77 \pm 0,21$ mg y 3dTx+G: $0,58 \pm 0,26$ mg; $p < 0,05$) respecto a la masa de células beta inicialmente transplantada (Figura 21).

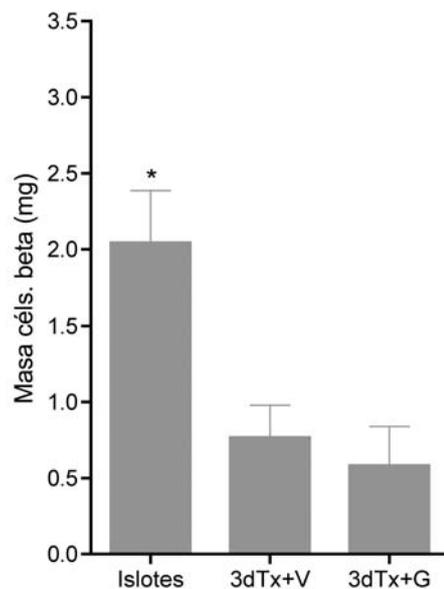


Figura 21: Masa de células beta en los islotes antes del Tx (n=4) o en los injertos de ratas Px tratadas con vehículo (n=6) o con el análogo de GLP-1 (n=6). Los valores corresponden a la media \pm error estándar. ANOVA $p < 0,02$ * $p < 0,01$ vs todos los demás para el test DMS.

Discusión

El GLP-1 es una hormona incretina con diversos efectos beneficiosos sobre las células beta pancreáticas. El progresivo conocimiento de los efectos y del mecanismo de acción del GLP-1 han permitido el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la diabetes. Entre ellos se hallan los análogos del GLP-1, capaces de unirse al receptor de GLP-1, que ya han sido incorporados como opción terapéutica en diversas guías de tratamiento de la diabetes tipo 2 (Nathan, Buse et al. 2009; Rodbard, Jellinger et al. 2009; Menéndez-Torre, Lafita-Tejedor et al. 2010).

El efecto insulíntrópico de los análogos del GLP-1 (Mojsov, Weir et al. 1987) ha sido ampliamente demostrado. Sin embargo, los efectos tróficos sobre las células beta (Doyle and Egan 2007) no están tan claros ya que existe una gran diversidad de resultados en diferentes modelos animales. En este estudio hemos caracterizado los efectos del análogo del GLP-1 NN0027 sobre la expansión de la masa beta en dos modelos animales de características distintas: la pancreatectomía parcial, un modelo de regeneración de la masa beta endógena y el trasplante de islotes, un modelo de terapia celular. De esta forma evaluamos su posible aplicación a dos posibles terapias de la diabetes, la inducción de la regeneración de la masa beta endógena y el aporte de una masa beta a partir de una fuente externa mediante el trasplante.

La pancreatectomía del 95% es un modelo de regeneración pancreática en el que tiene lugar una expansión de las células beta pancreáticas. La hipótesis del estudio era que la administración del análogo del GLP-1 NN0027 iba a incrementar esta regeneración pancreática y podría por lo tanto favorecer la normalización de la glucemia de los animales pancreatectomizados. Se evaluó principalmente la capacidad del análogo del GLP-1 de regenerar esta masa beta determinando el aumento de la proliferación y/o de la neogénesis.

El trasplante de islotes es una terapia emergente para el tratamiento de la diabetes que topa con algunas limitaciones. La más importante de ellas es la falta de tejido disponible para transplantar. Esta falta se agrava por la pérdida de masa beta del injerto que tiene lugar los primeros días después del trasplante. Nuestra hipótesis de trabajo era que la administración de GLP-1 podía tener efectos beneficiosos sobre el pronóstico del trasplante, incrementando la masa beta por un aumento en la proliferación de las células beta y reduciendo la pérdida de células beta transplantadas.

Este modelo de restablecimiento de la masa beta puede ser aplicable en el contexto del trasplante de islotes clínico ya que permitiría reducir el número de islotes necesarios para alcanzar la normoglicemia así como aumentar el éxito del injerto por mejora de la función de las células beta transplantadas o por aumento de la masa de células beta transplantadas.

Discusión

Con el objetivo de determinar si la hiperglucemia de los animales receptores era un requerimiento para obtener los efectos del GLP-1, se estudió el trasplante a receptores hiperglucémicos y a receptores normoglucémicos. Por otra parte, sabemos que durante los primeros días del trasplante, más de la mitad de la masa beta transplantada se pierde por mecanismos de muerte celular debido entre otros factores a la inflamación no específica del tejido transplantado. Para comprobar si el tratamiento con el análogo del GLP-1 era capaz de preservar la masa beta transplantada en esos primeros días se estudió el efecto del GLP-1 tres días después del trasplante.

El punto fundamental sobre el que se estudió el efecto del GLP-1 era la modificación de la masa beta. En animales de experimentación se ha descrito que la administración de GLP-1 puede promover el crecimiento de la masa beta en situaciones de hiperglucemia y restablecer la masa beta necesaria para la normalización de la glucosa sanguínea (Stoffers, Kieffer et al. 2000).

El aumento de la masa beta puede producirse por incrementos en la formación de células beta a partir de precursores (neogénesis), aumento del número de células beta por replicación de las ya existentes (proliferación), aumento del tamaño de las células beta (hipertrofia) o por disminución de la muerte celular, es decir, aumento de la supervivencia. Analizamos por lo tanto estos factores en las tres situaciones experimentales en las que nos hemos centrado para determinar sobre cuáles podría estar actuando el análogo del GLP-1.

En el estudio con ratas pancreatectomizadas hemos demostrado una importante mejora en el control metabólico de las ratas tratadas con NN0027. En efecto, la glucemia media de las ratas inyectadas con NN0027 -menor a 250mg/dL en todos los puntos-, se mantuvo durante los 15 días del estudio significativamente inferior a la de las ratas control inyectadas con el vehículo, que llegó a superar los 500 mg/dL. Además, el efecto beneficioso del tratamiento se manifestó de forma inmediata ya que a partir del día tres después de la pancreatectomía y del inicio del tratamiento la glucemia en el grupo GLP-1 ya era significativamente inferior a la del grupo vehículo.

Después de una pancreatectomía, la expansión de la masa beta se atribuye en parte a la formación de nuevas células beta por neogénesis. En efecto, en la literatura se ha descrito que a partir del día 3 después de la cirugía se produce una ola de proliferación en los ductos principales seguidos de los ductos secundarios que finaliza con la formación de nuevos lóbulos pancreáticos de tejido acinar e islotes (Brockenbrough, Weir et al. 1988; Bonner-Weir, Baxter et al. 1993). En este proyecto cuantificamos la diferenciación de células beta de forma indirecta determinando el número de células beta que se encuentran formando pequeñas agrupaciones esparcidas por el tejido exocrino, fuera de los islotes y la proximidad o contacto con los ductos pancreáticos en los

remanentes de las pancreatectomías. Estos métodos indirectos de determinación de la neogénesis se usaron dado que en ratas no se puede hacer trazado de linaje que sería un método directo de determinación. Este método nos permite detectar un aumento significativo de neogénesis respecto al sham 15 días después de la pancreatectomía en los animales tratados con el análogo del GLP-1. Por otra parte se determinó la proximidad de los islotes a los ductos pancreáticos. Una pequeña distancia entre el ducto y el islote sugiere que es un islote de nueva formación, que habría “brotado” a partir de células ductales precursoras. El porcentaje de islotes en posición periductal aumentó significativamente después de la pancreatectomía, sugiriendo la presencia de neogénesis. Sin embargo, aunque el porcentaje de islotes periductales en los remanentes de las ratas tratadas con el análogo del GLP-1 estaba claramente elevado respecto a las ratas sham, fue menor que el de las ratas pancreatectomizadas tratadas con vehículo. Este resultado podría interpretarse como indicativo de que la neogénesis a partir de los ductos pancreáticos fue menor en los animales tratados con el análogo de GLP-1, sugiriendo que otros tipos celulares podrían ser el origen del aumento de la neogénesis. Sin embargo, diferencias en la regeneración del páncreas exocrino interpuesto entre los ductos y los islotes, o incluso en la velocidad de migración de los islotes nuevamente formados en los animales tratados con el análogo de GLP-1 NN0027, podrían también justificar el resultado.

El tratamiento con el análogo del GLP-1 NN0027 durante 15 días después de la pancreatectomía aumentó la proliferación de las células beta. El aumento fue de más del 50% en comparación con la proliferación del grupo vehículo. En cambio, la replicación de las células beta en los animales pancreatectomizados tratados con el vehículo no se encontró aumentada respecto al sham en concordancia con un estudio previo en el que se sugería que dos semanas después de la pancreatectomía los niveles de replicación de las células beta han vuelto a los niveles basales. (Hayashi, Tamaki et al. 2003).

Los cambios en el tamaño de las células beta también pueden modificar la masa beta. Sin embargo, la administración del análogo del GLP-1 no causó hipertrofia de las células beta en comparación con el tamaño de las células beta en los páncreas de las ratas tratadas con vehículo.

En cuanto a la apoptosis de las células beta en los remanentes de las pancreatectomías, no había diferencias en la apoptosis de las células beta en ninguno de los tres grupos, animales sham y los pancreatectomizados tanto tratados con vehículo como con el análogo de GLP-1.

La masa de células beta de los remanentes pancreáticos de las ratas inyectadas con GLP-1 aumentó más de dos veces respecto a la masa de los remanentes de las ratas vehículo y más del triple respecto a la porción equivalente de los sham.

Discusión

Como parámetro complementario, de importancia contrastada en los procesos de reorganización del páncreas se estudió la vascularización de los islotes en los remanentes. Sin embargo, el GLP-1 no tenía efectos ni sobre la densidad vascular ni sobre el tamaño medio de los vasos o número de vasos por islote.

Nuestros resultados sugieren que el aumento de la masa beta en los animales pancreatectomizados tratados con el análogo del GLP-1 era debido principalmente al aumento de proliferación y neogénesis de las células beta, y descartamos que la hipertrofia jugara un papel decisivo en la modificación de la masa beta. Finalmente también demostramos que la apoptosis tampoco difería por lo que no tenía un papel relevante en las diferencias en la masa beta el estudio.

En definitiva nuestros resultados sugieren que la masa de células beta en los remanentes de los animales tratados con el análogo del GLP-1 respecto a los tratados con vehículo aumentó principalmente por mecanismos de aumento de la proliferación y de la neogénesis de las células beta. Este aumento de la masa beta en los animales pancreatectomizados tratados con el análogo del GLP-1 contribuía a prevenir el desarrollo de la hiperglucemia.

En cuanto a los efectos de la administración del análogo sobre el trasplante de islotes, la administración del análogo del GLP-1 a ratas diabéticas transplantadas con 800 islotes durante 14 días usando la misma pauta de dosificación que en las pancreatectomizadas también mejoró el control metabólico aunque en menor medida. La glucemia de las ratas transplantadas e inyectadas con NN0027 fue inferior en todo momento a la de los dos grupos control de ratas no transplantadas. En cambio, la glucemia del grupo de ratas inyectadas transplantadas y tratadas con vehículo solamente fue inferior a la de las ratas no transplantadas de forma transitoria. Así mismo, el porcentaje de animales curados en el grupo tratado con el análogo de GLP-1 fue mayor que en el grupo vehículo, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística.

Así pues, la administración de NN0027 tuvo efectos beneficiosos sobre la evolución metabólica de los animales transplantados que mostraron una mayor reducción de la hiperglucemia, aunque no fueron suficientemente importantes como para que las diferencias en la tasa de curación de los animales alcanzasen significación estadística. Se puede especular acerca de si el trasplante de una masa beta algo mayor a la empleada, hubiese puesto de manifiesto de forma más clara estos efectos beneficiosos.

La insulina plasmática se midió de forma directa en las ratas transplantadas. El cociente insulina/ glucosa nos da una indicación sobre la respuesta a la glucosa que presentan los diferentes grupos de animales hiperglucémicos del estudio. Tras el trasplante, encontramos un aumento de la

ratio, tanto a 7 como a 14 días, pero sin diferencias significativas entre los grupos GLP-1 y vehículo. Sin embargo la tendencia indica que los animales transplantados tratados con el NN0027 presentan un cociente más elevado que los animales H.Tx+V, en concordancia con la mejor evolución metabólica.

En el caso del trasplante a ratas diabéticas por STZ la replicación se encontró aumentada 14 días después del trasplante tanto en los animales tratados con el análogo como en los no tratados en comparación con la replicación de las células beta control del páncreas. Aunque se detectó una tendencia a un aumento de la replicación beta en los animales tratados con NN0027 respecto a los tratados con vehículo, la diferencia no alcanzó significación estadística. En los animales control normoglucémicos, trasplantados sin ser diabéticos, no hubo cambios en la replicación que era similar en los injertos y en el páncreas endógeno.

A los 3 días del trasplante, la replicación beta era similar entre los injertos, tanto de animales tratados con NN0027 como en los que recibieron vehículo, a la de los islotes de los páncreas endógenos de los animales control sanos.

Estos resultados concuerdan con datos previos de nuestro grupo en los que la replicación de las células beta transplantadas a ratas hiperglucémicas no se encontraba aumentada 3 días después del trasplante pero si lo estaba a 10 días. (Tellez, Montolio et al. 2007). También los resultados en normoglucemia coinciden con observaciones previas ya que el grupo demostró en el 2002 que en ratones diabéticos con normalización de la glucosa sanguínea por administración de insulina exógena la tasa de replicación de las células beta se mantenía sin cambios respecto al control tanto 3 como 10 y 30 días después del trasplante (Biarnes, Montolio et al. 2002).

Los resultados de nuestro estudio mostraron un efecto discreto del GLP-1 sobre la replicación de las células beta de los islotes transplantados a ratas hiperglucémicas mientras que no se observó ningún efecto de la administración en los primeros días o en las ratas normoglucémicas.

La apoptosis de las células beta, en el caso del trasplante a ratas diabéticas por STZ se encontró aumentada tanto 3 como 14 días después del trasplante y la inyección con el análogo del GLP-1 no consiguió prevenirla. En cambio en el trasplante a ratas normoglucémicas el porcentaje de células apoptóticas se mantuvo en ambos grupos igual que en el páncreas control.

En estudios previos en nuestro grupo hemos demostrado que después del trasplante de islotes a ratas diabéticas la apoptosis se mantiene aumentada al menos hasta 28 días después del trasplante (Tellez, Montolio et al. 2007). Además, en los trasplantes a 3 días se observa un gran aumento de la tasa de apoptosis de la células beta de los injertos. Entre los factores que pueden inducir muerte celular en los injertos de islotes se han descrito la inflamación no específica y la acción de las citoquinas pro-inflamatorias (Montolio, Téllez et al. 2007), el daño en los islotes producido durante el aislamiento (Vargas, Vives-Pi et al. 1998; Rosenberg, Wang et al. 1999), la masa

Discusión

inadecuada de tejido transplantada (Montaña, Bonner-Weir et al. 1993), la hipoxia (Dionne, Colton et al. 1993), la exposición a hiperglucemia (Merino, Nacher et al. 1997), la ausencia de factores de supervivencia (Ilieva, Yuan et al. 1999) o la disrupción de las conexiones con la matriz extracelular (Thomas, Contreras et al. 1999).

La masa beta de los animales transplantados (a medio y corto plazo) fue en todos los casos significativamente menor a la inicialmente transplantada. Además, tanto en el contexto hiperglucémico como en el normoglucémico el tratamiento con el análogo del GLP-1 no consiguió recuperar las células beta y la masa beta del injerto fue similar a la de los animales transplantados tratados con el vehículo.

En los animales hiperglucémicos transplantados tratados con GLP-1 durante 14 días, no se modificó la masa beta respecto a la del vehículo. En el grupo de transplantados normoglucémicos resulta lógico que no se observaran cambios en la masa beta ya que ni la replicación ni la apoptosis de las células beta estuvieron afectados por el tratamiento con NN0027. Y finalmente, el grupo de transplantados a 3 días nos permitió observar la importante caída de la masa beta en los injertos desde los primeros momentos del trasplante sobre la que la administración del análogo no tuvo ningún efecto.

La evolución metabólica de los animales tratados con el análogo del GLP-1 NN0027, tanto en el caso de los animales pancreatectomizados como en el de los animales diabéticos transplantados, es un parámetro clave que nos dio una primera indicación sobre el efecto del tratamiento con este análogo. En las pancreatectomías detectamos un efecto importante de prevención de la hiperglucemia que se correspondía con un aumento de la masa beta mientras que en los animales transplantados diabéticos la mejoría en la evolución metabólica era más sutil y no estaba acompañada por un aumento de la masa beta.

En ambos modelos cabe considerar que, además de los efectos tróficos sobre las células beta, la administración del NN0027 estimula también la secreción de insulina y por tanto contribuye al mejor control glucémico que observamos. En el caso de los animales transplantados no se consiguió demostrar el aumento de secreción pero la tendencia de los datos era muy evidente tanto a día 7 como a día 14 y por lo tanto asumimos que la administración de NN0027 sí que tuvo un efecto sobre la función de las células beta en nuestros experimentos.

In vitro, varios estudios han demostrado la capacidad de los agonistas del GLP-1R para estimular la diferenciación en células beta a partir de células ductales (Zhou, Wang et al. 1999; Yew,

Prasadan et al. 2004). Además, en diversos estudios en animales se han mostrado datos que sugieren que el tratamiento con análogos del GLP-1 puede promover la neogénesis de células beta. En 1999, Xu y colaboradores compararon el número de células extrainsulares en ratas pancreatectomizadas y tratadas con exendina-4 o vehículo y no encontraron diferencias. Atribuyeron la falta de efecto del análogo a que la situación de pancreatectomía ya es de por sí regenerativa y que es difícil aumentar aun más esa regeneración. Sin embargo, en las ratas sham tratadas con ex-4 sí que describieron un aumento del número de células beta extrainsulares respecto a las ratas sham no tratadas. (Xu, Stoffers et al. 1999). La infusión continua de GLP-1 en ratas Wistar intolerantes a la glucosa aumentó el número de células insulina positivas en los ductos (Perfetti, Zhou et al. 2000). En un estudio de administración neonatal de STZ Tourrel y colaboradores demostraron que la neogénesis de células beta en las ratas n0-STZ (múltiples dosis bajas de STZ desde el día del nacimiento) tratadas con exendina-4 aumentaba. Más adelante Bonner-Weir y colaboradores describieron un aumento del número de clusters de células productoras de insulina en los ductos de ratas SD diabéticas por STZ tratadas con exendina-4 (Xu, Kaneto et al. 2006), reafirmando la idea de que la neogénesis de células beta promovida por administración de exendina-4 se produce en los ductos pancreáticos.

Nuestros resultados muestran un aumento de la formación de células beta por diferenciación en las ratas pancreatectomizadas respecto al sham, lo que no coincide con los resultados de Xu en 1999 (Xu, Stoffers et al. 1999) que no detectaban diferencias entre las ratas Px, pero sí coincide con el mensaje general de los artículos previamente citados que afirman que la exendina aumenta la neogénesis de las células beta. Sin embargo, en cuanto a la proximidad de los ductos pancreáticos nuestros resultados no permitieron dilucidar si la neogénesis inducida por GLP-1 se producía a partir de los ductos pancreáticos o de otros tipos celulares.

En el estudio del trasplante de islotes no se exploró la neogénesis ya que al transplantar una preparación pura de islotes, no se disponía de precursores en el injerto que pudiesen dar lugar a neogénesis.

En definitiva, la administración del NN0027 tuvo efectos estimuladores de la diferenciación de células beta en los remanentes de las ratas pancreatectomizadas, que contribuyeron al aumento de la masa beta.

Un gran cantidad de artículos demuestran que la activación del receptor del GLP-1R (Buteau, Roduit et al. 1999; Buteau, Foisy et al. 2001; Jhala, Canettieri et al. 2003) en células beta *in vitro* aumenta su proliferación. Además, varios estudios con análogos del GLP-1 en modelos de deficiencia de masa beta *in vivo* han mostrado la capacidad para aumentar la replicación de las células beta (Farilla, Hui et al. 2002; Wang and Brubaker 2002). Nuestros resultados en los animales pancreatectomizados están en claro acuerdo con estos efectos proliferativos de los análogos del GLP-

Discusión

1 ya que detectamos un aumento importante, de más del 50% en comparación con la replicación en las ratas inyectadas con vehículo. Sin embargo, la replicación de las células beta en los grupos de transplantados prácticamente no se modificó con el tratamiento con el NN0027, ni a corto plazo en los días inmediatos al trasplante, ni a medio plazo. Dos estudios de trasplante de islotes en ratones diabéticos determinaron la replicación de las células beta en los injertos y tampoco observaron aumento de la replicación debido al tratamiento con el análogo del GLP-1.(Crutchlow, Yu et al. 2008; Merani, Truong et al. 2008). Sin embargo, ninguno de los dos estudios apuntó a una causa concreta por la que la no se haya podido dar el esperado efecto de la administración del análogo.

En definitiva, mientras que en las pancreatectomías el efecto sobre proliferación del NN0027 fue muy claro, sobre los trasplantes no se pudo establecer el aumento de la proliferación en las ratas diabéticas transplantadas a 14 días.

La muerte celular programada de las células beta se determinó en los tres estudios que se llevaron a cabo. No se encontraron diferencias en ninguno de los estudios entre animales tratados con el análogo de GLP-1 y los animales no tratados.

In vitro, la capacidad anti-apoptótica de los análogos del GLP-1 ha sido ampliamente demostrada frente a varios estímulos que causan la muerte celular programada de las células beta. El tratamiento con GLP-1 de diferentes líneas de células beta protegió de la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno (Hui, Wright et al. 2001), por ácidos grasos como el palmitato (Kwon, Pappan et al. 2004), por agentes inmunosupresores como la dexametasona (Ranta, Avram et al. 2006) o por citoquinas pro-inflamatorias (Li, El Kholy et al. 2005).

Sin embargo, en modelos *in vivo* en los que se induce apoptosis, la protección no siempre tiene lugar. Brubaker y colaboradores fueron los primeros en describir una disminución de la apoptosis en un modelo *in vivo* después de la administración de un análogo del GLP-1. Trataron ratones obesos db/db, de seis semanas de edad, antes de la aparición de la hiperglucemia, con exendina-4. A las dos semanas de tratamiento no solamente se previno la aparición de la diabetes sino que se encontró un aumento de la masa beta así como una importante disminución de la apoptosis (Wang and Brubaker 2002). De forma similar, el tratamiento con exendina-4 protegió de la apoptosis a las células beta de ratones C57BL6 inyectados con múltiples dosis bajas de STZ (Li, Hansotia et al. 2003). Sin embargo, el tratamiento con exendina 4 de ratas moderadamente hiperglucémicas no fue capaz de disminuir la apoptosis de las células beta (Xu, Kaneto et al. 2006). En este estudio la diabetes se indujo por inyección única de estreptozotocina y se empezó el tratamiento con exendina una semana después. Tras diez días el tratamiento se suspendió y se analizaron los parámetros histológicos diez días más tarde, momento en el que las ratas presentaban

una hiperglucemia más moderada, de unos 300 mg/dl. La evolución metabólica recuerda a los datos que se han obtenido en los transplantados diabéticos y coincide en la falta de efecto del GLP-1. Sin embargo, en este artículo no se señala cual podría ser la causa de la falta de efecto sobre la apoptosis aunque hipotetizamos que la hiperglucemia prolongada pueda estar involucrada.

Sin embargo, el estudio de Farilla (Farilla, Hui et al. 2002) demostró que la infusión continua de GLP-1 durante dos días a ratas Zucker diabéticas disminuyó la apoptosis de las células beta pancreáticas. El efecto del GLP-1 sobre la apoptosis de las células beta en este estudio era observado después de una infusión continua, mientras que los demás estudios trataron a los animales con el análogo una (Li, Hansotia et al. 2003; Xu, Kaneto et al. 2006) o dos veces día (Wang and Brubaker 2002). Es posible que los niveles circulantes de péptido fueran más importantes o que el hecho de encontrarse en sangre de forma continuada fueran determinantes para el efecto de protección de la apoptosis.

En los animales pancreatectomizados tratados con el análogo NN0027 no se observó aumento de la apoptosis por lo que el análogo del GLP-1 no podía ofrecer una protección frente a la apoptosis. En cambio en los trasplantes a animales hiperglucémicos, en los que los islotes estuvieron sometidos a una situación de hiperglucemia de forma crónica, hubo inducción de apoptosis pero el tratamiento con el NN0027 no consiguió prevenirla.

Por otra parte, en cuanto al efecto del análogo del GLP-1 en los primeros días postrasplante, sabemos que los procesos inflamatorios pueden ser de gran relevancia en estos primeros días (Montolio, Téllez et al. 2007). Dado que se ha descrito que el GLP-1 tiene una cierta actividad anti-inflamatoria *in vitro*, resultaba importante analizar si la administración del análogo tenía algún efecto sobre la apoptosis de los primeros días del trasplante. Los efectos anti-inflamatorios del GLP-1 podrían venir mediados por la inhibición de JAK1 y STAT1, que son mediadores de la acción de TNF- α (Couto, Minn et al. 2007) o por reversión de la inhibición de la fosforilación de ERK por citoquinas (Blandino-Rosano, Perez-Arana et al. 2008). *In vivo*, se sabe poco sobre los efectos de la administración de análogos del GLP-1 frente a la inflamación ya que solamente hay evidencias de que la administración de un agonista del receptor del GLP-1 reduce los niveles de insulitis en ratones NOD (Hadjiyanni, Baggio et al. 2008). Sin embargo, en los primeros días después del trasplante tampoco se observó efecto anti-apotótico sobre las células beta del injerto.

En definitiva, en ninguno de los estudios que hemos llevado a cabo hemos detectado inhibición de la apoptosis de las células beta por parte del tratamiento con NN0027.

Discusión

Los experimentos en animales pancreatectomizados nos han permitido estudiar los efectos de la administración de un análogo del GLP-1 en un modelo de regeneración de las células beta. Los efectos de este análogo fueron significativos y el control metabólico de los animales pancreatectomizados mejoró notablemente. Sin embargo, los efectos del análogo sobre las células transplantadas no fueron tan notables. La evolución metabólica de las ratas diabéticas por STZ transplantadas con una masa subcrítica de células beta y tratadas con el análogo del GLP-1 mejoraba de forma muy modesta y no se halló un efecto claro del análogo del GLP-1 sobre la proliferación de las células beta transplantadas ni en hiper ni en normoglucemia. La dosis y pauta de administración del fármaco fueron exactamente las mismas en los dos estudios (100µg/kg/día administrados en forma de inyección subcutánea una vez al día a partir del día de la cirugía) así como prácticamente igual la duración del estudio (15 días después de la pancreatectomía, 14 días después del trasplante).

El análisis comparativo de las diferentes situaciones en las que hemos descrito las acciones del análogo NN0027 nos permite considerar diferentes factores que pueden influir sobre el resultado de un tratamiento con GLP-1.

El proceso de la pancreatectomía instaura un clima regenerativo en todo el animal al que se le somete. Se induce la síntesis de muchos factores de crecimiento como por ejemplo VEGF (Oberghel, Sandler et al. 1997), Reg (Baeza, Moriscot et al. 1996) , el factor de transcripción c-myc (Laybutt, Glandt et al. 2003) y hasta el propio GLP-1 endógeno (De León, Deng et al. 2003) y probablemente muchos otros. Estos factores sintetizados como resultado de un daño en el tejido pancreático, seguramente responsables en parte de la regeneración que se observa en la pancreatectomía en condiciones basales, podrían interactuar o sinergizar con el GLP-1 administrado de forma exógena potenciando los efectos de este de una forma desconocida.

Se sabe que diversos factores de crecimiento como EGF, activina A, IGF-1, TNF- α y la propia insulina son capaces de estimular el VEGF, factor de crecimiento esencial en el proceso de angiogénesis (Roskoski 2007). Un estudio de 2007 demostró que los islotes transplantados a un roedor previamente pancreatectomizado se revascularizaban mejor que los transplantados a un animal control (Johansson, Jansson et al. 2007), sugiriendo que entre los factores inducidos por el proceso de la pancreatectomía alguno o algunos de ellos estaban facilitando el proceso de revascularización de los islotes.

En esta óptica quisimos estudiar la vascularización de los islotes en nuestro modelo de pancreatoclectomía y administración de GLP-1. Sin embargo, observamos que ni la densidad vascular ni el tamaño medio de los vasos estaban afectados por la administración del NN0027.

Un aumento de la vascularización de los islotes podría haber tenido algún tipo de efecto sobre los islotes. En primer lugar, un aumento del tamaño de los capilares sanguíneos tiene como consecuencia un aumento del flujo sanguíneo y por tanto del aporte de oxígeno (Nakatsu, Sainson et al. 2003). Y en segundo lugar un estudio del 2006 sugirió que las células endoteliales eran capaces de estimular la proliferación de las células beta a través de secreción de HGF (Johansson, Mattsson et al. 2006).

En efecto, se ha demostrado que algunas isoformas del VEGF-A son capaces de inducir el aumento del tamaño de los vasos por aumento del número de células endoteliales que los conforman (Nakatsu, Sainson et al. 2003). Por otra parte, el estudio de Johansson (Johansson, Mattsson et al. 2006) sugiere que existe una comunicación entre las células beta y las endoteliales. Las células beta secretan VEGF-A que junto con la insulina estimulan a las células endoteliales para secretar HGF que a su vez podría tener efectos mitógenicos sobre las células beta. Estos estudios parecen sugerir que el aumento de la vascularización de los islotes puede tener ciertos efectos pro-mitogénicos sobre las células beta además de mejorar el aporte sanguíneo de los islotes.

Por otra parte no podemos asegurar que los efectos del GLP-1 sobre los vasos sanguíneos hubiesen sido directos a través del receptor del GLP-1. Se ha demostrado que los análogos del GLP-1 presentan un abanico de acciones cardiovasculares como modulación de la presión sanguínea, del tono vascular y de la contractibilidad del miocardio (Yu, Moreno et al. 2003; Dozier, Cureton et al. 2009; Grieve, Cassidy et al. 2009). Aunque no está claro si se encuentran receptores de GLP-1 en los vasos sanguíneos, se sabe con certeza que el corazón expresa el receptor de GLP-1 (Campos, Lee et al. 1994; Bullock, Heller et al. 1996) y se ha detectado la expresión del receptor en el endotelio de la arteria pulmonar y coronaria (Richter, Feddersen et al. 1993; Ban, Noyan-Ashraf et al. 2008; Erdogdu, Nathanson et al. 2010).

Además de que es posible de que en los trasplantes no se sinteticen estos factores pro-regenerativos, las células beta de los mismos están sometidos a unos rangos de glucemia distintos, en los que la acción del análogo NN0027 puede ver modificado su efecto.

El NN0027 parece no tener ningún efecto sobre las células beta en situación de normoglucemia en nuestro estudio. El efecto estimulador del GLP-1 sobre la secreción de insulina solamente se produce en presencia de glucosa. Sin embargo, no se sabe con certeza si las vías de señalización de proliferación y supervivencia requieren la presencia de elevadas concentraciones de

Discusión

glucosa. En un estudio del 2003 se comparaba la respuesta frente a la administración de liraglutide, un análogo del GLP-1 similar al NN0027 en su concepción, a ratas diabéticas ZDF y normoglucémicas pancreatectomizadas al 60%. Se observaron grandes diferencias en la histología entre las ratas ZDF tratadas con liraglutide durante dos o seis semanas. En el tratamiento durante seis semanas se observó el esperado aumento de la replicación y masa de células beta mientras que a las dos semanas del tratamiento las ratas ZDF presentaban una masa y replicación disminuidas respecto a las ratas ZDF tratadas con vehículo. Los animales del estudio de las seis semanas estaban hiperglucémicos y los del estudio más corto, a dos semanas, aún se mantenían normoglucémicos. Además, en ratas pancreatectomizadas al 60%, que eran normoglucémicas tampoco se observó efecto de liraglutide en la proliferación ni en la masa beta (Sturis, Gotfredsen et al. 2003). Estos resultados sugieren que en situación de normoglucemia las células beta no modifican su replicación en respuesta al tratamiento con análogos del GLP-1.

Sin embargo, otro estudio del mismo año mostró un aumento de la masa beta en ratas normales a la semana de tratamiento pero que desaparecía a las seis semanas (Bock, Pakkenberg et al. 2003). No se especificaba en este estudio cual era el mecanismo de aumento de la masa beta pero lo que parecía quedar demostrado es que los efectos del GLP-1 en condiciones normoglucémicas solo aparecían de forma puntual. Otro estudio en el que también se estudió el tratamiento durante una semana reforzó estos datos mostrando un aumento de replicación y de genes relacionados con proliferación y diferenciación en ratones normoglucémicos (Shimoda, Kanda et al. 2011).

La mayoría de estudios parecen indicar que la hiperglucemia es necesaria para permitir los efectos de los análogos del GLP-1 sobre la replicación, aunque como hemos comentado algunos estudios han demostrado el efecto en normoglucemia en situaciones particulares. En efecto, es bien conocido que la glucosa puede actuar directamente como un mitógeno sobre las células beta (Martens and Pipeleers 2009). El metabolismo de la glucosa desencadena varias vías intracelulares que implican la activación de diferentes quinasas. Los efectos mitógenicos podrían venir por la activación de PKA a través del aumento del cAMP, mTOR a través del aumento de la ratio ATP/ADP o ERK entre otros (Briaud, Lingohr et al. 2003).

Como ya hemos descrito anteriormente, la activación del receptor del GLP-1 activa a su vez varias de estas vías y en especial aumenta la concentración de AMPc intracelular. Esta coincidencia en las vías intracelulares sugiere una sinergia entre los efectos de GLP-1 y la glucosa y en efecto sin glucosa no hay estimulación de la respuesta secretora por parte del GLP-1 (Kwon, Marshall et al. 2004).

El mecanismo propuesto (Martens and Pipeleers 2009) es que la glucosa refuerza la proliferación de las células beta por GLP-1 facilitando la activación de la PKA por la combinación

AMPC y calcio intracelular. Esta PKA subsecuentemente activará mTOR y señalará a núcleo por fosforilación del factor de transcripción CREB en un proceso reforzado por la activación de MEK1/ERK1/2 (Briaud, Lingohr et al. 2003; Kwon, Marshall et al. 2004; Costes, Broca et al. 2006).

La limitación de nuestro estudio en ese sentido es que no conseguimos observar un claro efecto de la administración del análogo NN0027 sobre la proliferación de la células beta en las ratas transplantadas hiperglucémicas. Por lo tanto no podemos extraer una conclusión clara en cuanto a la necesidad de una cierta hiperglucemia para que aparezcan los efectos de los análogos del GLP-1 sobre la proliferación beta.

A pesar de que acabamos de describir como la glucosa puede sinergizar con el GLP-1 para inducir la proliferación de las células beta es posible que la situación de hiperglucemia grave sostenida pueda constituir por varios motivos un ambiente desfavorable en el que la acción del análogo del GLP-1 está limitada. Esta podría ser una razón por la que no observamos el efecto beneficioso del análogo en los animales diabéticos transplantados. En este sentido, se ha correlacionado la presencia de niveles altos de glucemia con una disminución de la eficiencia de las incretinas para estimular la secreción de insulina (Knop, Vilsbøll et al. 2007; Højberg, Vilsbøll et al. 2009).

El estudio de Højberg comparó la respuesta a un clamp hiperglucémico de glucosa junto con una infusión de GLP-1 en pacientes obesos diabéticos de tipo 2 y con un pobre control glucémico con la respuesta en esos mismos pacientes después de cuatro semanas de tratamiento con insulina y con la casi-normalización de los niveles de glucosa plasmática. El estudio demostró que el efecto de la infusión de GLP-1 a niveles fisiológicos estaba reducido en los pacientes diabéticos, pero que se recuperaba después de la casi normalización de la glucosa plasmática, sugiriendo que la pérdida del efecto insulínico es secundaria al desarrollo de la diabetes, probablemente a consecuencia de la glucotoxicidad y proponiendo el concepto de que estos efectos puedan ser recuperados si se mejora el control metabólico.

El estudio de Knop y colaboradores va en esta línea y refuerza la hipótesis de Højberg. En él se comparó el efecto incretina en pacientes con pancreatitis crónica y con diabetes secundaria a ella o con tolerancia a la glucosa normal, en pacientes con diabetes tipo 2 y en personas sanas. El efecto incretina estaba reducido en los pacientes diabéticos con pancreatitis crónica en comparación con los pacientes con pancreatitis y tolerancia a la glucosa normal que presentaban un efecto incretina similar al de las personas sanas. Teniendo en cuenta que la diabetes asociada a pancreatitis crónica es secundaria, y poco atribuible a causas genéticas los resultados sugieren que el estado diabético causa una disfunción de las células beta que las hace resistentes a la acción de las hormonas incretínicas.

Discusión

Es bien conocido que la hiperglucemia puede favorecer la desdiferenciación de las células beta por modificación del patrón de expresión de los genes. En efecto, Laybutt y colaboradores (Laybutt, Hawkins et al. 2007) demostraron que las células beta transplantadas a ratas diabéticas veían reducida la expresión de importantes factores de transcripción como el *Pdx1*, *Nkx6.1* o de proteínas esenciales en el metabolismo de la glucosa como *Glut2*. Justamente el factor de transcripción PDX-1 es esencial en la vía de señalización por el GLP-1 y las acciones proliferativas y antiapoptóticas de los análogos del GLP-1 son dependientes de la expresión de PDX-1. En efecto, la expansión de la masa beta con agonistas del receptor del GLP-1 cursa con un aumento de la expresión de PDX-1 tanto en ratones diabéticos (Stoffers, Kieffer et al. 2000) como en ratas después de una pancreatectomía subtotal (Xu, Stoffers et al. 1999). De hecho, la inhibición de la expresión de PDX-1 se asocia con una reducción de la expresión del receptor del GLP-1 y con disminución de la sensibilidad a la exendina-4 *in vitro* (Wang, Iezzi et al. 2005). Además, los ratones con una inactivación específica del gen del PDX-1 presentan una mayor tasa de apoptosis y la exendina-4 no consigue estimular la proliferación de las células beta o inhibir la apoptosis en los islotes PDX-1 $-/-$ (Li, Cao et al. 2005).

Por otra parte se ha demostrado que altas concentraciones de glucosa reducen el aumento de AMPc en el citosol de la célula beta en respuesta a GLP-1. Esto sería debido a una marcada regulación a la baja de la Adenilato Ciclasa 8, central en la mediación de los efectos del GLP-1 sobre las células beta (Roger, Papin et al. 2011).

Además, parece ser que la situación de hiperglucemia también puede tener efectos sobre el receptor de GLP-1. Como describen en el artículo (Xu, Kaneto et al. 2007) la expresión del receptor de GLP-1 se inhibe *in vivo* en situación de hiperglucemia. La expresión del receptor a nivel de mRNA y de proteína se inhibía a partir de glucemias de 150 mg/dl de forma dosis dependiente por un mecanismo dependiente de PKC α de forma que la secreción de insulina en respuesta a la administración de GLP-1 también se encontró afectada en los animales pancreatectomizados de este estudio. Este efecto podría ser reversible si se restablecieran unos niveles de glucemia normales tal y como se demuestra para el receptor de GIP en un estudio (Piteau, Olver et al. 2007) en el que la normalización de la hiperglucemia en ratas Zucker recuperaba los niveles normales de mRNA del receptor de GIP en las células beta. Podríamos especular que en nuestras ratas pancreatectomizadas también se dio un cierto grado de regulación a la baja de los receptores de GLP-1 pero en menor medida (paralelamente a la hiperglucemia) que en los islotes transplantados a ratas diabéticas lo que explicaría la falta de efecto del análogo sobre el grupo de animales más hiperglucémicos del estudio.

Un gran número de estudios sobre los efectos de la administración de agonistas del receptor del GLP-1 en modelos animales en los que se estudia la masa beta son modelos de hiperglucemia moderada o de fases iniciales de la diabetes, en los que la desdiferenciación de las células beta podría no ser tan importante. Así pues, se han descrito aumentos en la masa beta con tratamiento con análogos de GLP-1 en ratas pancreatectomizadas al 90-95% (Xu, Stoffers et al. 1999), Wistar ligeramente intolerantes a la glucosa (Perfetti, Zhou et al. 2000), ratones db/db prediabéticos (Wang and Brubaker 2002) y ratones NOD prediabéticos (Zhang, Tokui et al. 2007). Sin embargo, sería preciso disponer de estudios diseñados para analizar esta cuestión, ya que también se han descrito efectos de la administración de análogos del GLP-1 sobre la masa beta en modelos animales de diabetes como en ratones db/db (Stoffers, Kieffer et al. 2000; Rolin, Larsen et al. 2002), ratas ZDF (Farilla, Hui et al. 2002) y ratas Sprague-Dawley diabéticas por STZ (Xu, Kaneto et al. 2006).

Respecto al caso particular del trasplante de islotes, ya hemos nombrado anteriormente dos estudios de trasplante de islotes a roedores en los que no se estimulaba la proliferación de las células beta. Sin embargo, mientras que en el estudio del grupo de Stoffers no se describieron efectos beneficiosos de la exendina-4 ni sobre proliferación ni sobre apoptosis ni sobre vascularización (Crutchlow, Yu et al. 2008), en el estudio del grupo de Shapiro la administración de liraglutide sí que resultó en un mejor pronóstico del injerto, con inhibición de la apoptosis y reducción en el tiempo necesario para conseguir la normalización de la glucemia (Merani, Truong et al. 2008). Ya en el 2005 Weir sugirió que la administración de GLP-1 en el trasplante de islotes podía tener efectos beneficiosos. Sin embargo en su estudio solamente se demostró la utilidad del precultivo de los islotes con Ex-4 que, a pesar de ser más beneficioso que el cultivo solo, sin exendina-4, no conseguía mejorar el pronóstico del trasplante comparado con el trasplante de islotes frescos.

En pacientes, al menos dos artículos han descrito los efectos de la exenatida sobre personas transplantadas. En el primero de ellos se demostró que 3 meses de exenatida resultaban en una reducción del 40% de los requerimientos de insulina (Ghofaili, Fung et al. 2007) mientras que en el otro, de 6 meses de duración, se describió una reducción de los requerimientos de insulina del 40% en los primeros cuatro meses pero que caía al 20% entre los cinco y seis meses de tratamiento (Froud, Faradji et al. 2008). Sin embargo en una carta al editor en la revista *Transplantation* surgieron críticas a estos dos artículos atenuando el optimismo sobre la utilización de análogos del GLP-1 en el trasplante de islotes (Rickels and Naji 2009).

En definitiva, no parece quedar muy claro si es la situación de hiperglucemia o algún factor desconocido propio del trasplante de islotes lo que provoca los escasos efectos de la administración de GLP-1 en el trasplante de islotes experimental.

Discusión

Todo parece indicar por tanto que la situación más desfavorable en los injertos a animales diabéticos ha sido la causa por la que no se han podido observar claramente los efectos de la administración del NN0027. En la pancreatectomía las células beta se encuentran en un ambiente normal, y el análogo evita o reduce el desarrollo de la hiperglucemia. Además es un modelo en el que no hemos detectado aumento de apoptosis por lo que podemos inferir que el ambiente es mucho menos deletéreo que en el caso de los trasplantes. En contraste, los islotes transplantados están sometidos desde el primer momento a varios estímulos de muerte importantes (que ya hemos descrito anteriormente) así como a una hiperglucemia grave sostenida. Con los datos actuales no es posible saber si una dosis mayor, o una dosificación en dos veces al día hubiera podido permitir observar mayores efectos sobre las células beta pancreáticas.

La edad y cepa de los animales con los que estamos trabajando también difiere ligeramente y podrían ser una fuente de variabilidad en los resultados que hemos obtenido. Las ratas que se utilizaron en las pancreatectomías son ratas Sprague Dawley y eran muy ligeramente más jóvenes, de cinco semanas de edad, mientras que las utilizadas para el trasplante eran ratas singénicas Lewis de 6-8 semanas de edad.

La proliferación de las células beta de las ratas se modifica a largo de la vida del animal siendo mucho mayor en animales de un mes de edad (Montanya, Nacher et al. 2000). Las ratas utilizadas en nuestro estudio solo difieren de un par de semanas de edad. Por otra parte, las cepas SD y Lewis han sido ampliamente utilizadas en el pasado en estudios de masa beta y a nuestro conocer no se ha publicado ningún estudio que ponga de manifiesto diferencias esenciales entre las dos cepas de ratas. Por tanto, a la hora de plantear el estudio se asumió que ambos grupos de animales de experimentación eran equivalentes. Sin embargo, se detectaron diferencias significativas entre la replicación basal en los páncreas de las ratas SD sham ($0,72 \pm 0,18\%$) y en los páncreas de las ratas Lewis ($0,26 \pm 0,05\%$). Aunque estas diferencias afectan a los valores basales de replicación, no forzosamente tienen que implicar diferencias en la capacidad de estimulación de estas células.

En el presente estudio hemos demostrado que el tratamiento con el análogo del GLP-1 en dos modelos diferentes de deficiencia de masa beta tiene claros efectos sobre la regulación de la glucosa sanguínea y un efecto estimulador de la proliferación sobre las células beta. En las ratas pancreatectomizadas, el tratamiento con el análogo del GLP-1 evitó la aparición de hiperglucemia severa y aumentó la masa de células beta por aumento de neogénesis de células beta y proliferación de las mismas. En los animales transplantados los efectos fueron menos aparentes, aunque detectamos una tendencia a un mejor control metabólico y un discreto aumento de la replicación de

las células beta en caso de los animales diabéticos. No se pudo demostrar protección frente a la apoptosis por el tratamiento con el GLP-1 en ninguno de nuestros grupos experimentales. En conjunto, los resultados muestran que los efectos de GLP-1 sobre la masa beta pueden ser diferentes dependiendo de las características y situación del receptor del tratamiento. En esta tesis se muestra que el mismo tratamiento puede incrementar de forma muy significativa la masa beta en modelos de regeneración en los que induce un aumento de la neogénesis y replicación beta, mientras que, el efecto sobre la masa beta en otros modelos como el trasplante de islotes, el efecto sobre la replicación fue muy escaso o inexistente, y no modificó la masa beta. En ninguno de los dos modelos se detectó una reducción de la apoptosis beta con el tratamiento con el análogo de GLP-1 NN0027, a pesar de que in vitro GLP-1 ha mostrado un efecto protector sobre las células beta en numerosos estudios.

Discusión – Referencias Bibliográficas

- Astrup, A., S. Rössner, et al. (2009). "Effects of liraglutide in the treatment of obesity: a randomised, double-blind, placebo-controlled study." Lancet **374**(9701): 1606-1616.
- Baeza, N., C. Moriscot, et al. (1996). "Reg protein: a potential beta-cell-specific growth factor?" Diabetes Metab **22**(4): 229-234.
- Ban, K., M. Noyan-Ashraf, et al. (2008). "Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways." Circulation **117**(18): 2340-2350.
- Biarnes, M., M. Montolio, et al. (2002). "Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia." Diabetes **51**(1): 66-72.
- Blandino-Rosano, M., G. Perez-Arana, et al. (2008). "Anti-proliferative effect of pro-inflammatory cytokines in cultured beta cells is associated with extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway inhibition: protective role of glucagon-like peptide -1." J Mol Endocrinol **41**(1): 35-44.
- Bock, T., B. Pakkenberg, et al. (2003). "The endocrine pancreas in non-diabetic rats after short-term and long-term treatment with the long-acting GLP-1 derivative NN2211." APMIS **111**(12): 1117-1124.
- Bonner-Weir, S., L. Baxter, et al. (1993). "A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development." Diabetes **42**(12): 1715-1720.
- Briaud, I., M. K. Lingohr, et al. (2003). "Differential activation mechanisms of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic beta-cells." Diabetes **52**(4): 974-983.
- Brockenbrough, J., G. Weir, et al. (1988). "Discordance of exocrine and endocrine growth after 90% pancreatectomy in rats." Diabetes **37**(2): 232-236.
- Bullock, B., R. Heller, et al. (1996). "Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor." Endocrinology **137**(7): 2968-2978.
- Buteau, J., S. Foisy, et al. (2001). "Protein kinase Czeta activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic beta-cell proliferation." Diabetes **50**(10): 2237-2243.
- Buteau, J., R. Roduit, et al. (1999). "Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells." Diabetologia **42**(7): 856-864.
- Campos, R., Y. Lee, et al. (1994). "Divergent tissue-specific and developmental expression of receptors for glucagon and glucagon-like peptide-1 in the mouse." Endocrinology **134**(5): 2156-2164.
- Costes, S., C. Broca, et al. (2006). "ERK1/2 control phosphorylation and protein level of cAMP-responsive element-binding protein: a key role in glucose-mediated pancreatic beta-cell survival." Diabetes **55**(8): 2220-2230.
- Couto, F. M., A. H. Minn, et al. (2007). "Exenatide blocks JAK1-STAT1 in pancreatic beta cells." Metabolism **56**(7): 915-918.

- Crutchlow, M., M. Yu, et al. (2008). "Exendin-4 does not promote Beta-cell proliferation or survival during the early post-islet transplant period in mice." Transplant Proc **40**(5): 1650-1657.
- De León, D., S. Deng, et al. (2003). "Role of endogenous glucagon-like peptide-1 in islet regeneration after partial pancreatectomy." Diabetes **52**(2): 365-371.
- Dionne, K. E., C. K. Colton, et al. (1993). "Effect of hypoxia on insulin secretion by isolated rat and canine islets of Langerhans." Diabetes **42**(1): 12-21.
- Doyle, M. E. and J. M. Egan (2007). "Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas." Pharmacol. Ther. **113**(3): 546-593.
- Dozier, K., E. Cureton, et al. (2009). "Glucagon-like peptide-1 protects mesenteric endothelium from injury during inflammation." Peptides **30**(9): 1735-1741.
- Erdogdu, O., D. Nathanson, et al. (2010). "Exendin-4 stimulates proliferation of human coronary artery endothelial cells through eNOS-, PKA- and PI3K/Akt-dependent pathways and requires GLP-1 receptor." Mol Cell Endocrinol **325**(1-2): 26-35.
- Farilla, L., H. Hui, et al. (2002). "Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats." Endocrinology **143**(11): 4397-4408.
- Froud, T., R. N. Faradji, et al. (2008). "The use of exenatide in islet transplant recipients with chronic allograft dysfunction: safety, efficacy, and metabolic effects." Transplantation **86**(1): 36-45.
- Ghofaili, K. A., M. Fung, et al. (2007). "Effect of exenatide on beta cell function after islet transplantation in type 1 diabetes." Transplantation **83**(1): 24-28.
- Grieve, D., R. Cassidy, et al. (2009). "Emerging cardiovascular actions of the incretin hormone glucagon-like peptide-1: potential therapeutic benefits beyond glycaemic control?" Br J Pharmacol **157**(8): 1340-1351.
- Hadjiyanni, I., L. L. Baggio, et al. (2008). "Exendin-4 modulates diabetes onset in nonobese diabetic mice." Endocrinology **149**(3): 1338-1349.
- Hayashi, K. Y., H. Tamaki, et al. (2003). "Differentiation and proliferation of endocrine cells in the regenerating rat pancreas after 90% pancreatectomy." Arch Histol Cytol **66**(2): 163-174.
- Hui, H., C. Wright, et al. (2001). "Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells." Diabetes **50**(4): 785-796.
- Højberg, P. V., T. Vilsbøll, et al. (2009). "Four weeks of near-normalisation of blood glucose improves the insulin response to glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide in patients with type 2 diabetes." Diabetologia **52**(2): 199-207.
- Ilieva, A., S. Yuan, et al. (1999). "Pancreatic islet cell survival following islet isolation: the role of cellular interactions in the pancreas." J Endocrinol **161**(3): 357-364.
- Jhala, U. S., G. Canettieri, et al. (2003). "cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2." Genes Dev. **17**(13): 1575-1580.

Discusión – Referencias Bibliográficas

- Johansson, M., A. Andersson, et al. (2006). "Perinatal development of the pancreatic islet microvasculature in rats." J Anat **208**(2): 191-196.
- Johansson, M., L. Jansson, et al. (2007). "Improved vascular engraftment and function of autotransplanted pancreatic islets as a result of partial pancreatectomy in the mouse and rat." Diabetologia **50**(6): 1257-1266.
- Johansson, M., G. Mattsson, et al. (2006). "Islet endothelial cells and pancreatic beta-cell proliferation: studies in vitro and during pregnancy in adult rats." Endocrinology **147**(5): 2315-2324.
- Knop, F. K., T. Vilsbøll, et al. (2007). "Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state?" Diabetes **56**(8): 1951-1959.
- Kwon, G., C. Marshall, et al. (2004). "Signaling elements involved in the metabolic regulation of mTOR by nutrients, incretins, and growth factors in islets." Diabetes **53 Suppl 3**: S225-232.
- Kwon, G., K. L. Pappan, et al. (2004). "cAMP Dose-dependently prevents palmitate-induced apoptosis by both protein kinase A- and cAMP-guanine nucleotide exchange factor-dependent pathways in beta-cells." J.Biol.Chem. **279**(10): 8938-8945.
- Larsen, P., C. Fledelius, et al. (2001). "Systemic administration of the long-acting GLP-1 derivative NN2211 induces lasting and reversible weight loss in both normal and obese rats." Diabetes **50**(11): 2530-2539.
- Laybutt, D., M. Glandt, et al. (2003). "Critical reduction in beta-cell mass results in two distinct outcomes over time. Adaptation with impaired glucose tolerance or decompensated diabetes." J Biol Chem **278**(5): 2997-3005.
- Laybutt, D. R., Y. C. Hawkins, et al. (2007). "Influence of diabetes on the loss of beta cell differentiation after islet transplantation in rats." Diabetologia **50**(10): 2117-2125.
- Li, L., W. El Kholy, et al. (2005). "Glucagon-like peptide-1 protects beta cells from cytokine-induced apoptosis and necrosis: role of protein kinase B." Diabetologia **48**(7): 1339-1349.
- Li, Y., X. Cao, et al. (2005). "beta-Cell Pdx1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1." Diabetes **54**(2): 482-491.
- Li, Y., T. Hansotia, et al. (2003). "Glucagon-like peptide-1 receptor signaling modulates beta cell apoptosis." J.Biol.Chem. **278**(1): 471-478.
- Martens, G. A. and D. Pipeleers (2009). "Glucose, regulator of survival and phenotype of pancreatic beta cells." Vitam Horm **80**: 507-539.
- Menéndez-Torre, E., J. Lafita-Tejedor, et al. (2010). "Recomendaciones para el tratamiento farmacológico de la hiperglucemia en la diabetes tipo 2. Documento de Consenso." Avances en Diabetología **26**(5): 331-338.
- Merani, S., W. Truong, et al. (2008). "Liraglutide, a long-acting human glucagon-like peptide 1 analog, improves glucose homeostasis in marginal mass islet transplantation in mice." Endocrinology **149**(9): 4322-4328.

- Merino, J. F., V. Nacher, et al. (1997). "Improved outcome of islet transplantation in insulin-treated diabetic mice: effects on beta-cell mass and function." Diabetologia **40**(9): 1004-1010.
- Mojsov, S., G. C. Weir, et al. (1987). "Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas." J Clin Invest **79**(2): 616-619.
- Montanya, E., V. Nacher, et al. (2000). "Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy." Diabetes **49**(8): 1341-1346.
- Montaña, E., S. Bonner-Weir, et al. (1993). "Beta cell mass and growth after syngeneic islet cell transplantation in normal and streptozocin diabetic C57BL/6 mice." J Clin Invest **91**(3): 780-787.
- Montolio, M., N. Téllez, et al. (2007). "Role of blood glucose in cytokine gene expression in early syngeneic islet transplantation." Cell Transplant **16**(5): 517-525.
- Nakatsu, M. N., R. C. Sainson, et al. (2003). "VEGF(121) and VEGF(165) regulate blood vessel diameter through vascular endothelial growth factor receptor 2 in an in vitro angiogenesis model." Lab Invest **83**(12): 1873-1885.
- Nathan, D. M., J. B. Buse, et al. (2009). "Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes." Diabetes Care **32**(1): 193-203.
- Oberg-Welsh, C., S. Sandler, et al. (1997). "Effects of vascular endothelial growth factor on pancreatic duct cell replication and the insulin production of fetal islet-like cell clusters in vitro." Mol Cell Endocrinol **126**(2): 125-132.
- Perfetti, R., J. Zhou, et al. (2000). "Glucagon-like peptide-1 induces cell proliferation and pancreatic-duodenum homeobox-1 expression and increases endocrine cell mass in the pancreas of old, glucose-intolerant rats." Endocrinology **141**(12): 4600-4605.
- Piteau, S., A. Olver, et al. (2007). "Reversal of islet GIP receptor down-regulation and resistance to GIP by reducing hyperglycemia in the Zucker rat." Biochem Biophys Res Commun **362**(4): 1007-1012.
- Ranta, F., D. Avram, et al. (2006). "Dexamethasone induces cell death in insulin-secreting cells, an effect reversed by exendin-4." Diabetes **55**(5): 1380-1390.
- Richter, G., O. Feddersen, et al. (1993). "GLP-1 stimulates secretion of macromolecules from airways and relaxes pulmonary artery." Am J Physiol **265**(4 Pt 1): L374-381.
- Rickels, M. R. and A. Naji (2009). "Exenatide use in islet transplantation: words of caution." Transplantation **87**(1): 153; author reply 154.
- Rodbard, H. W., P. S. Jellinger, et al. (2009). "Statement by an American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology consensus panel on type 2 diabetes mellitus: an algorithm for glycemic control." Endocr Pract **15**(6): 540-559.

Discusión – Referencias Bibliográficas

- Roger, B., J. Papin, et al. (2011). "Adenylyl cyclase 8 is central to glucagon-like peptide 1 signalling and effects of chronically elevated glucose in rat and human pancreatic beta cells." Diabetologia **54**(2): 390-402.
- Rolin, B., M. O. Larsen, et al. (2002). "The long-acting GLP-1 derivative NN2211 ameliorates glycemia and increases beta-cell mass in diabetic mice." Am.J.Physiol Endocrinol.Metab **283**(4): E745-E752.
- Rosenberg, L., R. Wang, et al. (1999). "Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death." Surgery **126**(2): 393-398.
- Roskoski, R. J. (2007). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression." Crit Rev Oncol Hematol **62**(3): 179-213.
- Shimoda, M., Y. Kanda, et al. (2011). "The human glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide preserves pancreatic beta cells via regulation of cell kinetics and suppression of oxidative and endoplasmic reticulum stress in a mouse model of diabetes." Diabetologia **54**(5): 1098-1108.
- Stoffers, D., T. Kieffer, et al. (2000). "Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas." Diabetes **49**(5): 741-748.
- Sturis, J., C. F. Gotfredsen, et al. (2003). "GLP-1 derivative liraglutide in rats with beta-cell deficiencies: influence of metabolic state on beta-cell mass dynamics." Br.J.Pharmacol. **140**(1): 123-132.
- Tellez, N., M. Montolio, et al. (2007). "Adenoviral overproduction of interleukin-1 receptor antagonist increases beta cell replication and mass in syngeneically transplanted islets, and improves metabolic outcome." Diabetologia **50**(3): 602-611.
- Thomas, F. T., J. L. Contreras, et al. (1999). "Anoikis, extracellular matrix, and apoptosis factors in isolated cell transplantation." Surgery **126**(2): 299-304.
- Vargas, F., M. Vives-Pi, et al. (1998). "Endotoxin contamination may be responsible for the unexplained failure of human pancreatic islet transplantation." Transplantation **65**(5): 722-727.
- Wang, H., M. Iezzi, et al. (2005). "Suppression of Pdx-1 perturbs proinsulin processing, insulin secretion and GLP-1 signalling in INS-1 cells." Diabetologia **48**(4): 720-731.
- Wang, Q. and P. L. Brubaker (2002). "Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice." Diabetologia **45**(9): 1263-1273.
- Xu, G., H. Kaneto, et al. (2007). "Downregulation of GLP-1 and GIP Receptor Expression by Hyperglycemia: Possible Contribution to Impaired Incretin Effects in Diabetes." Diabetes.
- Xu, G., H. Kaneto, et al. (2006). "GLP-1/exendin-4 facilitates beta-cell neogenesis in rat and human pancreatic ducts." Diabetes Res Clin Pract.
- Xu, G., D. A. Stoffers, et al. (1999). "Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats." Diabetes **48**(12): 2270-2276.
- Yew, K. H., K. L. Prasad, et al. (2004). "Interplay of glucagon-like peptide-1 and transforming growth factor-beta signaling in insulin-positive differentiation of AR42J cells." Diabetes **53**(11): 2824-2835.

- Yu, M., C. Moreno, et al. (2003). "Antihypertensive effect of glucagon-like peptide 1 in Dahl salt-sensitive rats." J Hypertens **21**(6): 1125-1135.
- Zhang, J., Y. Tokui, et al. (2007). "Continuous stimulation of human glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in a mouse model (NOD) delays onset of autoimmune type 1 diabetes." Diabetologia **50**(9): 1900-1909.
- Zhou, J., X. Wang, et al. (1999). "Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells." Diabetes **48**(12): 2358-2366.

Conclusiones

1. El tratamiento con el análogo del GLP-1 humano NN0027 a ratas con una pancreatectomía parcial del 95% estimuló la regeneración de las células beta pancreáticas incrementando tanto la replicación como la neogénesis de las células beta.

2. Los efectos beneficiosos de la administración del análogo del GLP-1 humano NN0027 sobre la replicación y neogénesis de las células beta se tradujeron en un aumento de la masa beta que contribuyó reducir los niveles de hiperglucemia en los animales pancreatectomizados.

3. El tratamiento con el análogo del GLP-1 humano NN0027 a ratas diabéticas que recibieron un trasplante de islotes mejoró la evolución metabólica de los animales trasplantados, pero no tuvo efectos sobre la replicación, la supervivencia, ni la masa beta del injerto.

4. Los efectos beneficiosos de la administración del análogo del GLP-1 humano NN0027 a ratas diabéticas con un trasplante de islotes serían atribuibles al efecto sobre la función de las células beta trasplantadas.

5. La administración del análogo del GLP-1 humano NN0027 no redujo la apoptosis de las células beta en los primeros días del trasplante y no disminuyó la pérdida masiva de células beta característica de este periodo.

6. Los distintos efectos obtenidos sobre la replicación y la masa de las células beta usando el mismo diseño de tratamiento con el análogo del GLP-1 NN0027 en los dos modelos estudiados, la pancreatectomía parcial y el trasplante de islotes, sugieren que los efectos de la administración de tratamientos basados en la acción de GLP-1 pueden ser distintos en función de las características o situación metabólica del receptor del tratamiento.

Producción científica durante el transcurso de esta tesis

1. Publicaciones

Optimization of human pancreatic islet isolation with a newly designed cooling system for COBE 2991.

Nacher M, Barceló V, Escoriza J, **Joanny G**, Núñez-Ollé M, Montanya E
Transplant Proc. 2009 Jul-Aug;41(6):2202-3

Gastrin Treatment Stimulates β -Cell Regeneration and Improves Glucose Tolerance in 95% Pancreatectomized Rats.

Téllez N, **Joanny G**, Escoriza J, Vilaseca M, Montanya E
Endocrinology. 2011 Jul;152(7):2580-8

Heterozygous inactivation of Na/Ca exchanger increases glucose-induced insulin release, beta-cell proliferation and mass

Nguidjoe E, Sokolow S, Bigabwa S, Pachera N, Allagnat F, Vanderwinden JM, Sener A, Manto M, Depreter M, Mast J, **Joanny G**, Montanya E, Rahier J, Cardozo AK, Eizirik DL, Schurmans S, Herchuelz A
Diabetes. 2011 Aug;60(8):2076-85

2. Comunicaciones a Congresos

2.1 Presentaciones orales

Reunión Anual de Redimet (Red de Diabetes i Enfermedades Metabólicas del Instituto Carlos III)
Cardona, 16 y 17 de octubre de 2007

Aumento de replicación y masa de células beta en ratas pancreatectomizadas al 95% tratadas con un análogo del GLP-1.

Joanny G, Téllez N y Montanya E.

TONECA (Coordination Action on the Aetiology, Pathology and Prediction of Type I Diabetes in Europe) Final Symposium

Siena 4-6 May 2008

GLP-1 analogue treatment increases beta cell replication and improves metabolic outcome in streptozotocin-diabetic rats transplanted with an insufficient beta cell mass

Géraldine Joanny, Noèlia Téllez, Jéssica Escoriza, Joan Soler and Eduard Montanya

EASD Islet Study Group Symposium 2008

Frascati 11-13 September 2008

GLP-1 analogue treatment increases β -cell replication and improves metabolic outcome in transplanted STZ-diabetic rats

Géraldine Joanny, Noèlia Téllez, Jéssica Escoriza, Joan Soler and Eduard Montanya

1ª reunión anual Centro de Investigación Biomédica en red de diabetes y enfermedades metabólicas asociadas (CIBERDEM)

Vall de Núria, 21-23 Octubre 2008

GLP-1 analogue treatment increases β -cell replication and improves metabolic outcome in STZ-diabetic rats transplanted with an insufficient beta cell mass

Géraldine Joanny, Noèlia Téllez, Jéssica Escoriza, Joan Soler and Eduard Montanya

2.2. Presentaciones de Poster

43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Amsterdam 17-21 September 2007

Increased beta cell replication and mass in 95% pancreatectomized rats treated with a DPPIV stabilized GLP-1 analogue

G. Joanny, N. Téllez, E. Estil·les, M. Nacher, S. Rodríguez-Mulero, E. Montanya, Spain

EASD Islet Study Group Symposium 2007

Brussels 21-23 September 2007

Increased beta cell replication and mass in 95% pancreatectomized rats treated with a DPPIV stabilized GLP-1 analogue

G. Joanny, N. Téllez, J. Escoriza and E. Montanya

TONECA (Coordination Action on the Aetiology, Pathology and Prediction of Type I Diabetes in Europe) Final Symposium

Siena 4-6 May 2008

GLP-1 analogue treatment increases beta cell replication and improves metabolic outcome in streptozotocin-diabetic rats transplanted with an insufficient beta cell mass

Géraldine Joanny, Noèlia Téllez, Jéssica Escoriza, Joan Soler and Eduard Montanya

44rd Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes,

Rome 8-11 September 2008

GLP-1 analogue treatment increases beta cell replication and improves metabolic outcome in streptozotocin-diabetic rats transplanted with an insufficient beta cell mass

Géraldine Joanny, Noèlia Téllez, Jéssica Escoriza, Joan Soler and Eduard Montanya

Esta tesis ha contado con ayudas por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS PI-060891), Novo Nordisk SLE (Copenhague), Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (Grupo de Investigación Consolidado SGR) y del CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas (CIBERDEM).

La doctoranda ha percibido ayudas del IDIBELL y de la Facultat de Medicina de la UB.

