

FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA

ESTUDIO MEDIANTE ANIMALES TRANSGENICOS
DEL PAPEL DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO Y
EL IGF-I EN EL DESARROLLO DE DIABETES
MELLITUS

CRISTINA COSTA VALLES

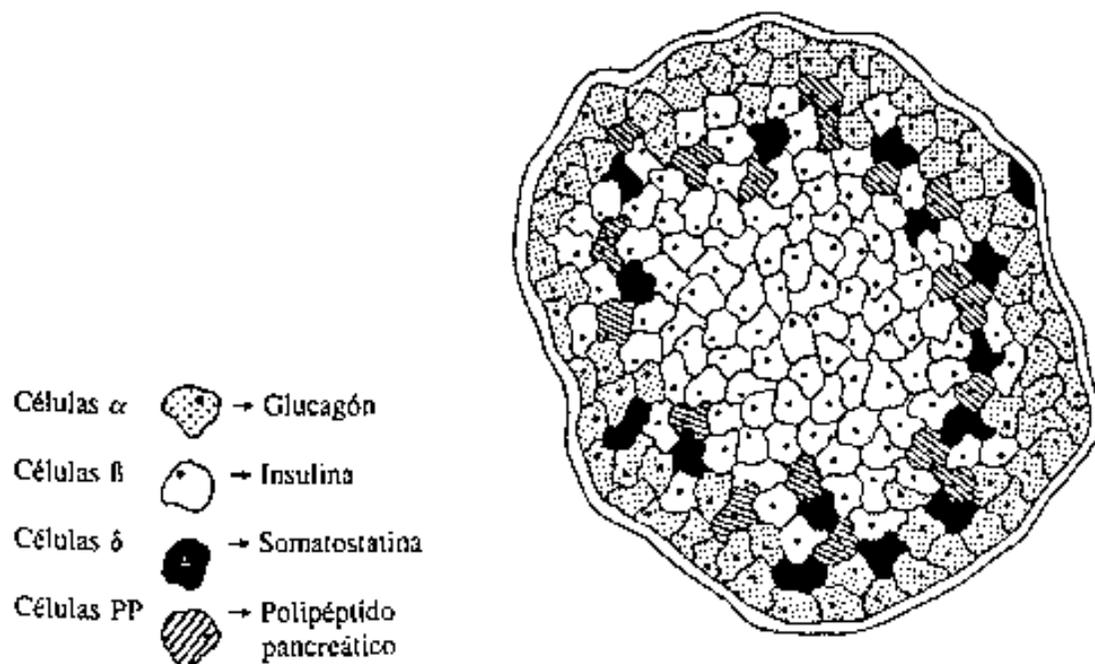
PARTE II

RATONES TRANSGENICOS QUE EXPRESAN IGF-I EN CELULAS B DEL PANCREAS

PARTE II: INTRODUCCION

1. ESTRUCTURA Y FUNCION DEL PANCREAS

El páncreas, situado en la cavidad abdominal y delimitado por el marco duodenal y el bazo, presenta dos funciones claramente diferenciadas, una exocrina y otra endocrina. Su porción acinar de función exocrina segrega al duodeno enzimas digestivas e iones, mientras su función endocrina es llevada a cabo por los pequeños acúmulos celulares que constituyen los islotes de Langerhans. Estos están formados por cuatro tipos celulares distintos: células α , β , δ y células PP, productoras respectivamente de glucagón, insulina, somatostatina y polipéptido pancreático. Presentan una distribución característica. Las células α ocupan la periferia, las β , mayoritarias, la parte central del islote, y entre las dos se encuentran algunas células δ y PP. Las hormonas que producen son liberadas directamente a los capilares sanguíneos y a través de la vena porta son transportadas hasta el hígado y al resto del organismo (Esquema I).



Esquema I. Distribución de los 4 tipos celulares en el islote de Langerhans. El islote pancreático está formado por células α , que ocupan la periferia del islote, células β , situadas en la parte central, y células δ y PP, distribuidas en la zona intermedia.

1.1. FISILOGIA DE LA CELULA β DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS

La secreción de insulina por las células β de los islotes de Langerhans es fundamental en la regulación de la homeostasia energética y en el control de la glucemia. Un aumento en la secreción de insulina evita la hiperglucemia, mientras que el glucagón y la adrenalina se liberan en caso de hipoglucemia. Las alteraciones funcionales de las células β pancreáticas desencadenan graves problemas metabólicos como la diabetes mellitus.

Se conocen muchos factores reguladores de la biosíntesis y secreción de insulina. Entre ellos: los nutrientes (además de la glucosa, azúcares distintos de la glucosa, aminoácidos, cuerpos cetónicos y ácidos grasos), mediadores del sistema nervioso (noradrenalina, galanina, acetilcolina, péptido intestinal vasoactivo (VIP)), eucosanoides (PGE_2), señales hormonales (glucagón, péptido inhibitorio gástrico (GIP), GLP-1 (glucagón-like peptide), colecistoquinina) y agentes farmacológicos (sulfonilureas). Así pues, los niveles de insulina sérica están controlados en cada momento por las variaciones de las concentraciones extracelulares de nutrientes, hormonas y neurotransmisores. La respuesta insulinosecretora de la célula β a todos los reguladores fisiológicos es rápida, produciéndose segundos después de la exposición a los estímulos. Por otra parte, cambios en la situación fisiológica del animal (modificaciones debidas a factores ontogénicos, nutricionales o endocrinos) conducen a regulaciones adaptativas más lentas de la célula β (regulación a largo plazo). Estas están representadas por variaciones en la cantidad de mRNA de la insulina. De este modo, establecen el contenido de insulina de la célula β que la capacita para responder a los cambios de glucosa sérica a lo largo del día o períodos más prolongados (Portha, 1991; Docherty y Clark, 1994). Actualmente se ha empezado a comprender cómo los nutrientes, los neurotransmisores o las hormonas provocan variaciones en ciertos factores intracelulares que pueden tener el papel de mensajeros (cAMP, iones Ca^{2+} , fosfoinositoles) en estos procesos (Portha, 1991, Liang y Matchinsky, 1994).

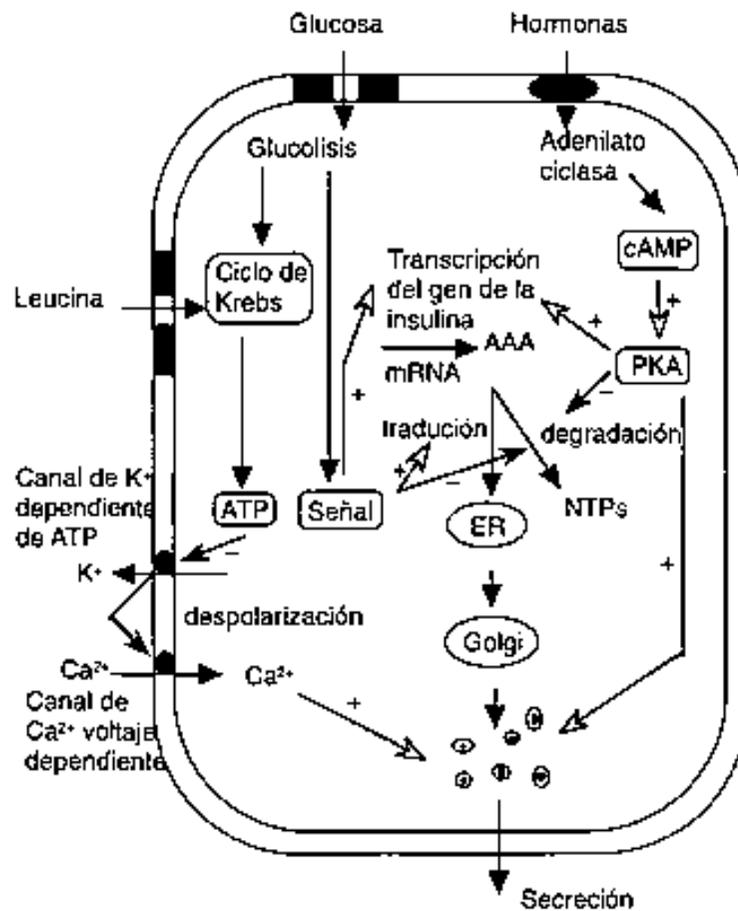
1.1.1. Regulación de la biosíntesis de insulina

La insulina es sintetizada a partir de un precursor, la preproinsulina, que es procesada por proteólisis post-traducciona. Los 25 primeros aminoácidos de la molécula, que constituyen el péptido señal, permiten su entrada a la luz del retículo endoplasmático mientras se está sintetizando. Una vez dentro del retículo, esta secuencia es eliminada, formándose la proinsulina. En el aparato de Golgi, la proinsulina parece estar asociada a un receptor específico presente en la cara interna de la membrana. La proinsulina abandona la parte *trans* del Golgi incluida en vesículas revestidas de clatrina. Estas vesículas o gránulos inmaduros sufrirán una acidificación de su contenido y la proinsulina será convertida en insulina (Halban, 1990). Tres enzimas presentes en el gránulo inmaduro son responsables de esta conversión. Las endopeptidasas PC 1 y PC 2 cortan los residuos básicos entre el péptido C

y las cadenas A y B. La carboxipeptidasa H elimina los residuos terminales (Hutton, 1989). El gránulo pierde el revestimiento de clatrina y la vesícula madura que resulta es un gránulo liso que contiene la insulina cristalizada (en forma de hexámeros con átomos de Zn^{2+}), una cantidad equimolecular de péptido C soluble y un poco de proinsulina residual no procesada. La vesícula madura puede almacenarse, secretarse por exocitosis o degradarse por fusión con lisosomas (Schnell y col., 1988).

La glucosa es el principal regulador de la biosíntesis de insulina. Los efectos de la glucosa son esencialmente: 1) A concentraciones de 3,3 mM o superiores, estimula el inicio de traducción mediante un incremento de la transferencia de mRNA citosólico a la fracción ribosomal. 2) Incrementa la transferencia de mRNA de la insulina, una vez iniciada la traducción, de ribosomas libres a ribosomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico, y 3) Incrementa la elongación del mRNA de la preproinsulina (Welsh y col., 1986). Esta estimulación de la traducción de los mRNA de la preproinsulina se detecta a los pocos minutos de la elevación de la concentración de glucosa (Welsh, 1989).

El control de la producción de insulina a largo plazo viene mediado por cambios de expresión del gen de la insulina. Así, se observa una disminución del mensajero de la hormona en situaciones de ayuno prolongado (Giddings y col., 1982). Mientras una exposición prolongada a la glucosa (varias horas) conduce a la máxima estimulación de la transcripción del gen de la insulina y estabilización de los mRNA (Welsh y col., 1985). Los mensajeros intracelulares implicados en el efecto de la glucosa sobre la síntesis de la insulina son poco conocidos. La glucosa debe ser metabolizada en la célula β para ejercer su efecto (Goodison y col., 1992; German, 1993). La leucina y su producto metabólico, el 2-cetoisocaproato, incrementan la cantidad de mRNA de la insulina. Señalan, por tanto, un papel del metabolismo mitocondrial en el control de la expresión de este gen (Welsh y col., 1987). El glucagón a través de un incremento en los niveles de cAMP estimula la expresión de preproinsulina en presencia de glucosa. La somatostatina y la dexametasona conducen a una disminución de la cantidad de mRNA de la insulina a través de mecanismos que involucran al cAMP (Philippe, 1993; Knight y Docherty, 1992). Por otro lado, el papel del calcio es controvertido. En algunos estudios la inducción de la transcripción de insulina es inhibida por agentes bloqueantes de canales de Ca^{2+} (Efrat y col., 1991), mientras en otros no ocurre (Goodison y col., 1992) (Esquema II).



Esquema II. Mecanismos que regulan la biosíntesis de insulina.

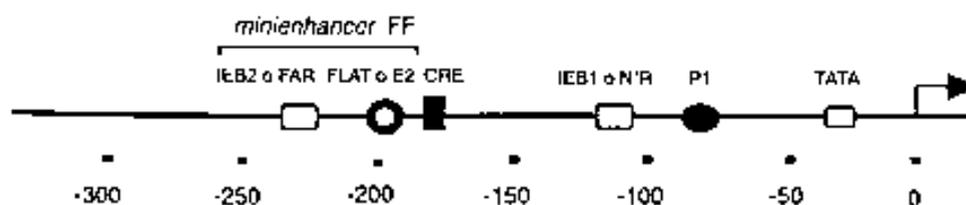
El metabolismo de la glucosa y de la leucina a través de la glucólisis y el ciclo de Krebs genera una o varias señales que afectan la producción de insulina a varios niveles. Incrementa la transcripción del gen, la vida media del mRNA de la insulina, mediante una reducción de su degradación, y aumenta la eficiencia de su traducción a proteína. Las hormonas afectan la biosíntesis de la insulina mediante variaciones en los niveles de cAMP. Un incremento de cAMP activa la PKA, que aumenta la transcripción del gen de la insulina y reduce la degradación de su mRNA. El papel del Ca²⁺ en la inducción de la transcripción de insulina no es claro (Docherty y Clark, 1994).

1.1.2. El promotor de la insulina

El control de la transcripción del gen de la insulina se lleva a cabo mediante la interacción de factores de transcripción con elementos *cis* presentes en el promotor del gen. El promotor de los genes de rata I y II y el promotor del gen de la insulina humana son los promotores de la insulina mejor caracterizados. Los primeros elementos que se describieron en el promotor de insulina de rata I (RIP I) fueron los de especificidad de tejido (Edlung y

col., 1985). Estudios de transfección de células con diversas porciones del promotor RIP I fusionadas al gen marcador CAT permitieron identificar varias secuencias *cis* y factores de transcripción, unos con carácter ubicuo y otros específicos de célula β . Mediante mutagénesis del fragmento de -333 a +51 se han determinado tres regiones que al ser modificadas afectan de forma marcada la transcripción del gen marcador. Una de ellas se ha identificado como la caja TATA y las otras dos coinciden con dos secuencias idénticas de 8 pb (GCCATCTG) a -105 y -231. Estos motivos se denominaron caja IBE1 (o NIR) e IBE2 (o FAR), respectivamente, y pertenecen a un grupo mayor de secuencias reguladoras de la especificidad de tejido (Docherty y Clark, 1994).

Otras secuencias de interés son las cajas TAAT, una proximal a -77 y otras cuatro alrededor de la posición -198. Estas últimas se agrupan en el denominado elemento FLAT, muy próximo al elemento FAR, con el que funciona sinérgicamente. Esta región de -196 a -247, también denominada *mini-enhancer FF*, confiere la capacidad de respuesta a la glucosa (Melloul, D. y Cerasi, 1994). Por el momento se ha identificado un único factor de transcripción implicado en la señal de la glucosa, el C1, que se asocia al elemento FLAT (Mellouli y col., 1993). También se ha podido identificar un elemento de respuesta a cAMP (5'TGACGTCC3') entre las posiciones -184 y -177 (Phillipe y col., 1990). Se ha postulado que tanto el glucagón como la glucosa y algunos aminoácidos pueden regular la transcripción a través de este elemento de respuesta incrementando los niveles intracelulares de cAMP. En el esquema III se resumen los elementos de respuesta en el promotor de insulina de rata I identificados hasta el momento.



Esquema III. Región promotora/reguladora del gen de la insulina de rata I.

Sitios de unión a factores de transcripción. Elementos involucrados en la transcripción del gen: Caja TATA, IEB1 (o NIR), IEB2 (o FAR). Elementos que confieren especificidad de tejido: IEB1, IEB2 y FLAT. Elemento de respuesta a cAMP: CRE. Elemento de respuesta a glucosa: *mini-enhancer FF*.

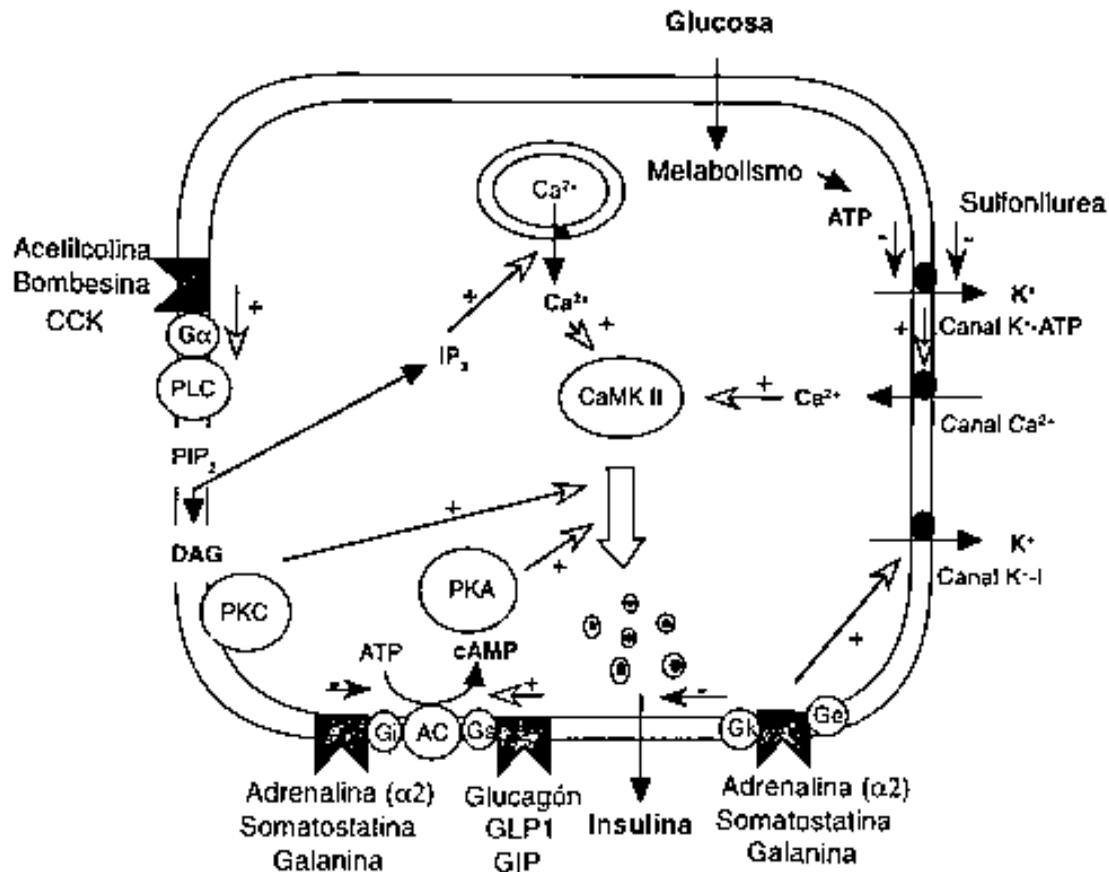
Diversos trabajos con animales transgénicos describen que los promotores de los dos genes de insulina de rata y el promotor humano dirigen la expresión de genes de forma específica a las células β del páncreas (Hanahan, 1985; Selden y col., 1986a; Adams y col., 1987; Dandoy-Dron y col., 1991). Selden y col. (1986a) han demostrado que la estricta regulación que se conoce de la expresión de la insulina endógena por glucosa, aminoácidos o agentes hipoglucemiantes como la tolbutamida se mantiene en el transgén.

1.1.3. Regulación de la secreción de insulina

Los mecanismos por los cuales la glucosa conduce a un aumento de mensajeros secundarios y a la secreción de insulina no son bien conocidos, aunque probablemente lo hace a través de múltiples vías. Gran número de evidencias parecen indicar que el transportador de glucosa GLUT-2, específico de páncreas e hígado, y la glucoquinasa están involucrados en el control del metabolismo de la glucosa en las células β de los islotes. Se ha propuesto que estas proteínas actuarían conjuntamente como un *glucostato* que modula la secreción de insulina en respuesta a cambios en la concentración de glucosa circulante (Meglasson y Matschinsky, 1986; Newgard y col., 1990; Johnson y col., 1990). Sin embargo, la glucosa debe ser metabolizada para producir las señales que conducen a la secreción de insulina. La naturaleza de estas señales es desconocida. Se requiere la metabolización de la glucosa-6-fosfato a través de la glucólisis y el ciclo de Krebs para observar una respuesta secretora adecuada. Sin embargo, una señal de secreción se puede producir durante la glucólisis pues el gliceraldehído, que entra en esta vía como triosa fosfato, es un potente estimulador de la secreción. Por el contrario, el piruvato, que se metaboliza en la mitocondria, sólo es capaz de amplificar la respuesta secretora a la glucosa. Diferentes hexosas (D-glucosa, D-galactosa, D-manosa o D-fructosa) estimulan la secreción de insulina de forma paralela a la velocidad de su utilización en la célula β . Por otro lado, el efecto estimulador de la leucina es mediado por la metabolización mitocondrial del producto de su desaminación, el 2-cetoisocaproato. Además de la leucina, otro secretagogo eficaz en ausencia de glucosa es la arginina. Sin embargo, la arginina no actúa a través de su metabolización, sino mediante despolarización de la membrana plasmática. La glutamina, por otro lado, potencia la estimulación producida por la leucina, facilitando la desaminación del glutamato por la glutamato deshidrogenasa (Ashcroft y Ashcroft, 1992).

La metabolización de la glucosa conduce a un aumento de la relación ATP/ADP, cambios en el estado redox (conversión de NAD(P)⁺ a NAD(P)H), cambios en el pH intracelular, un incremento de malonil CoA y un incremento del metabolismo de fosfolípidos (Docherty y Clark, 1994). La estimulación por glucosa conduce, también, a una reducción rápida y sostenida de la salida de K⁺. Esta se produce por el cierre de los canales de K⁺ dependientes de ATP cuando aumenta la relación ATP/ADP al metabolizarse el azúcar. Este fenómeno conduce a la abertura de los canales de Ca²⁺ por despolarización de la membrana

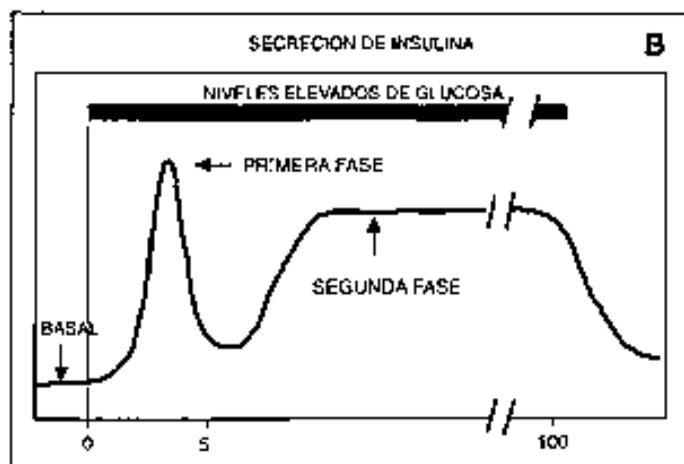
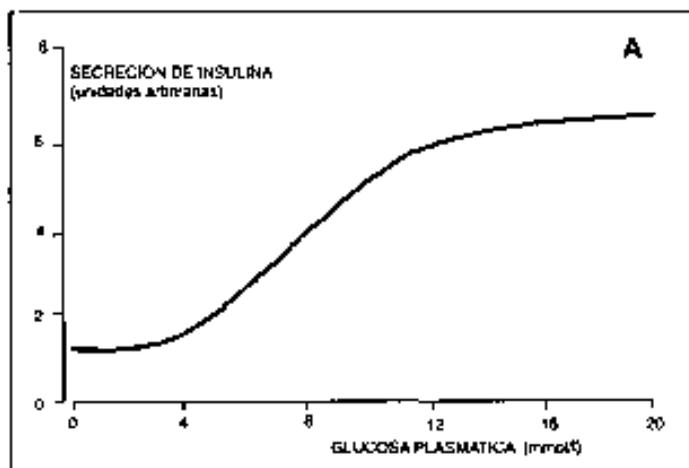
plasmática con entrada masiva de este ión y en consecuencia, estimula la secreción de insulina (Ashcroft y col., 1984). En la célula β , el ión calcio juega un papel crucial en el acoplamiento estimulación-secreción. Un aumento en los niveles de Ca^{2+} citosólico en la célula β es un requisito para la liberación de los gránulos secretores (Wollheim y Sharp, 1981; Herchuelz y Malaisse, 1981; Hellman, 1986; Henquin, 1987) (Esquema IV).



Esquema IV. Mecanismos de regulación de la secreción de insulina.

Inicio de la secreción de insulina por glucosa y sulfonilureas implica el cierre de los canales de K⁺-ATP y entrada de Ca²⁺ a través de canales de Ca²⁺ de tipo L. La proteína quinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina de tipo II (CaMKII) juega presumiblemente un papel importante en la mediación de la secreción de insulina por Ca²⁺. Hormonas y neurotransmisores actúan a diferentes niveles en la célula β . Potencian la secreción mediante activación de las proteína quinasa A y C, por cAMP y DAG, respectivamente. Estos mediadores se producen en respuesta a la activación de la adenilato ciclasa (AC) o la fosfolipasa C (PLC) por la unión de efectores a receptores de membrana asociados a proteínas G_s y G_q. La activación de PLC también produce IP₃, que libera Ca²⁺ de almacenes intracelulares. También se producen efectos inhibitorios de la secreción, mediante inhibición de la adenilato ciclasa, por unión de efectores a receptores asociados a G_i (Ashcroft, 1994).

Además, la amplitud de la respuesta insulínica a la glucosa no depende sólo de la concentración del metabolito en cada instante, sino también de la velocidad con que varían estas concentraciones (Wollheim y Sharp, 1981). Así, un aumento brusco de la tasa de glucosa provoca una respuesta secretora rápida y transitoria, denominada fase precoz o 1ª fase, la cual se corresponde con una apertura de los canales de Ca^{2+} y una liberación de los gránulos secretores adyacentes a la membrana. La fase tardía, por el contrario, se desarrolla lentamente y persiste varias horas mientras la tasa de glucosa permanece elevada. Esta fase implica la secreción de los gránulos maduros, pero en exposiciones crónicas al azúcar, se liberan preferentemente aquellos que están en curso de síntesis (Esquemas VA,B).



Esquema V. Respuesta insulínica a la glucosa.

A) Curva de respuesta insulínica a concentraciones crecientes de glucosa. Mediante un experimento de incubación estática de islotes aislados, se observa un incremento de la secreción de insulina frente a concentraciones crecientes de glucosa, que gráficamente adquiere forma de curva sigmoide. B) Curva de respuesta insulínica a la estimulación con elevada concentración de glucosa. Mediante un experimento de perfusión de islotes aislados, en que se determina la cantidad de insulina secretada minuto a minuto, se observa una curva secretora bifásica característica. Durante los primeros minutos se produce una respuesta aguda, seguida de un corto período refractario, que precede a un incremento sostenido de secreción de la hormona. Esta alcanza un estado de meseta que se mantiene durante el tiempo de exposición a elevada concentración de glucosa.

La secreción de insulina inducida por glucosa también está sujeta a modulación por hormonas y neurotransmisores. Entre los factores hormonales se conocen agentes tanto estimuladores como inhibidores de la secreción de insulina. Estimuladores potentes son el glucagón y las incretinas GLP-1 (*Glucagon-like Peptide 1-(7-37)*), GIP (*Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide*) y VIP (*Vasoactive Intestinal Peptide*). Estos efectores actúan mediante activación de la adenilato ciclasa provocando un incremento en los niveles de cAMP (Lu y col., 1993; Wheeler y col., 1993). Distintos inhibidores de la secreción de insulina, como la adrenalina, somatostatina, prostaglandina E₂ y galanina, también llevan a cabo su acción mediante regulación de los niveles de cAMP. Estas hormonas conducen a un descenso del nucleótido cíclico mediante activación de proteínas G inhibitoras (Sjöholm, 1991; Goke y col., 1989; Seaquist y col., 1989; Cormot y col., 1991). El Ca²⁺ está íntimamente relacionado con los niveles de cAMP. Estos se regulan a través del complejo Ca²⁺-calmodulina, que potencia la actividad de la adenilato ciclasa. Además está involucrado en el propio mecanismo por el cual el cAMP estimula la secreción de insulina, puesto que un incremento de cAMP conduce a un incremento de entrada de Ca²⁺ a través de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. Sin embargo, este mecanismo, que viene mediado por una activación de la proteína quinasa A, sólo es responsable de un 20% de la acción del cAMP sobre la secreción de insulina (Ämmälä y col., 1993) (Esquema IV).

El tercer elemento a tener en cuenta en la transmisión de la señal que conduce a la secreción de insulina es la hidrólisis de los fosfatidilinositoles por la fosfolipasa C. El inositol trifosfato generado moviliza el Ca²⁺ desde el retículo endoplásmico, mientras el diacilglicerol estimula la proteína quinasa C (PKC). Un incremento del flujo de fosfatidil inositoles conduce a una ligera estimulación de la secreción. Este es el mecanismo por el cual actúa la incretina colecistoquinina (CCK). Sin embargo, en presencia de niveles elevados de cAMP la CCK produce una dramática respuesta secretora, incluso con niveles moderados de glucosa. Esta respuesta es más pronunciada en la fase aguda de la secreción (Zavalich y col., 1988). Es claro que las tres vías de señalización están íntimamente relacionadas entre sí y que todas ellas actúan a través de las proteína quinasas. La respuesta exocítica se incrementa en gran medida en condiciones que promueven la fosforilación de proteínas, como activación de las proteínas quinasas A, C y proteína quinasa dependiente de Ca²⁺-calmodulina, o inhibición de las proteína fosfatasas (Ämmälä y col., 1994). En el esquema IV se resumen las distintas vías de transducción de señal, así como los principales factores reguladores de la secreción de insulina que se conocen en la actualidad. Finalmente, queda todavía por establecer cuales son los mecanismos moleculares, la naturaleza exacta de los substratos de las proteína quinasas, que conducen a la exocitosis del gránulo de insulina.

2. DIABETES MELLITUS

La alteración de la homeostasia de la glucosa sanguínea por disfunción en la secreción y/o acción de la insulina, conduce a diabetes mellitus. Esta es una de las enfermedades metabólicas más frecuentes en medicina humana, aunque afecta a muchas otras especies. Incluye un amplio abanico de síndromes con diferentes etiologías que afectan de un 1 a un 6% de la población mundial. Se manifiesta fundamentalmente por trastornos en el metabolismo hidrocarbonado, pero también altera el de lípidos y proteínas (Unger y Foster, 1985; Taylor y Agius, 1988). Estas alteraciones metabólicas son causa de graves complicaciones a nivel vascular, ocular, renal y neural. Se distinguen diferentes tipos de diabetes según el origen y tipo de alteraciones metabólicas. De un 10 a un 25% de los pacientes se agrupan en la categoría de diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) o diabetes tipo I. La IDDM se manifiesta generalmente antes de los 40 años, frecuentemente durante la adolescencia, y es debida a una destrucción autoinmune de las células β . El resultado es una carencia insulínica que conduce a hiperglucemia y cetonemia (Champsaur y col., 1980). Los síntomas más característicos son poliuria, polidipsia y pérdida de peso. La terapia sustitutoria con insulina es imprescindible, no sólo para control de la hiperglucemia, sino para evitar el coma diabético debido a cetosis espontánea y la muerte del paciente.

Mucho más común es la diabetes no dependiente de insulina (NIDDM) o diabetes tipo II. Se manifiesta en individuos adultos y, al menos en los estadios iniciales, no se caracteriza por una deficiencia de insulina. Por el contrario, se produce incapacidad de la hormona de actuar eficientemente en los tejidos diana. Esta resistencia a la insulina se evidencia al observarse hiperinsulinemia acompañada de hiperglucemia. A diferencia de la IDDM, el componente hereditario es clave en el desarrollo de NIDDM. La obesidad es uno de los problemas más importantes asociados a esta enfermedad. En estadios iniciales los pacientes de NIDDM no requieren tratamiento con insulina para sobrevivir. La mayor parte recibe tratamientos de dieta restringida con o sin hipoglucemiantes orales. Algunos pacientes progresan a un estado de deficiencia en insulina y se deben tratar con esta hormona.

La NIDDM no se define como una entidad patológica concreta, sino como un síndrome que abarca una serie de patologías con características comunes. Las causas de la NIDDM son, por tanto, diversas, y en la mayor parte de los casos, desconocidas. Desde un primer momento, se ha intentado buscar una causa única para esta mayoría de casos desconocidos. Se han barajado diferentes hipótesis, unas basadas en la disfunción de las células β y otras en la resistencia a la insulina en los tejidos periféricos. El estudio de las alteraciones de los principales genes implicados en la regulación de la secreción de insulina y de su acción en los tejidos ha de ser fundamental para comprender el origen y el desarrollo de la enfermedad.

Dado que la aparición de NIDDM se produce en forma de una pérdida paulatina de

la tolerancia a la glucosa, es posible que el origen de esta alteración sea un fallo de la funcionalidad de la célula β (Hales, 1994). La insulinemia basal de los pacientes con NIDDM es normal o elevada (DeFronzo y col., 1983). Sin embargo, en situaciones de incremento de la glucemia, como en un test de tolerancia, se observa en los pacientes con NIDDM un nivel anormalmente bajo de insulina sérica. Este defecto se observa tanto en la primera como en la segunda fase de la secreción de la hormona. Por el contrario, no se observa alteración en la respuesta insulinosecretora bajo un estímulo de infusión endovenosa de arginina (Ward y col., 1984). Se han barajado diversas causas de esta falta de sensibilidad de la célula β a la glucosa. Estas podrían situarse en diferentes niveles de la vía de captación/utilización del azúcar. Por un lado, se ha descrito en varios modelos animales de NIDDM una disminución de la expresión del transportador de glucosa GLUT-2 y se ha postulado como posible causa de la enfermedad (Ohneda y col., 1993). Sin embargo, no es claro que éste sea un defecto primario, ni tampoco que la reducción observada sea suficiente para el desarrollo de la NIDDM. En cambio, se ha confirmado un caso de NIDDM en humanos debido a una mutación del GLUT-2 (Mueckler y col., 1994). Por otro lado, una disminución de la fosforilación de la glucosa por la glucoquinasa en la célula β podría ser otra causa de diabetes. Se ha podido establecer que las familias que desarrollan un tipo de NIDDM denominado MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*) presentan diferentes mutaciones en este enzima (Vionnet y col., 1992). También se ha propuesto que una deficiente actividad de la enzima mitocondrial glicerolfosfato deshidrogenasa ligada a FAD puede ser causa del desarrollo de NIDDM. Se ha observado disminuida su actividad en diversos modelos animales como las ratas GK y Zucker fa/fa, o los ratones db/db (Malaisse, 1994). Sin embargo, basándose en el mismo modelo de rata GK, otros autores consideran que este defecto no es causa primaria, sino consecuencia de la diabetes de estos animales (Hughes y col., 1994).

La resistencia a la insulina puede definirse como una disminución del efecto biológico de la hormona en los tejidos diana. En los pacientes con NIDDM se aprecia tanto un impedimento en la captación y utilización de la glucosa por los tejidos sensibles a insulina (músculo, hígado y tejido adiposo), como un aumento de la producción hepática del azúcar. En un primer momento, la disminución del número de receptores de insulina en los tejidos se consideró como la causa principal de la falta de respuesta a la hormona. Sin embargo, estudios posteriores señalaron que probablemente éste era un efecto secundario a la hiperglucemia e hiperinsulinemia y no causa primaria de esta anomalía. Además, muchos otros factores contribuyen a la insensibilidad a la glucosa, como son la obesidad, la edad, la falta de ejercicio, la dieta y factores genéticos (DeFronzo, 1987). Podrían ser causa de NIDDM alteraciones moleculares que afectasen la funcionalidad del receptor de insulina, como defectos en la unión hormona-receptor o en el sistema de transducción de señal. Se ha descrito que la actividad tirosina quinasa de la subunidad β del receptor está disminuida en algunos modelos animales (Caro y col., 1986; Freidenberg y col., 1987). En pacientes con NIDDM se han detectado mutaciones en el dominio quinasa del receptor (Grunberger y col., 1984; Odawara y col., 1989; Taira y col., 1989), así como unos pocos casos de mutaciones

que conducen a deficiencias en el procesamiento y transporte del proreceptor o de reciclaje del receptor (Yoshimasa y col., 1988; Kadowaki y col., 1988; Kobayashi y col., 1988). Tampoco se deben descartar posibles anomalías postreceptor en pacientes diabéticos que afecten a elementos de la cascada de transducción de señal, o finalmente, a enzimas involucrados en el metabolismo de la glucosa (Kahn, 1978; Häring y Mehnert, 1993). En resumen, el origen de la resistencia a la insulina es aún desconocido. Los animales transgénicos modelos de diabetes pueden ser de ayuda para conocer los orígenes de esta enfermedad.

2.1. COMPLICACIONES SECUNDARIAS DE LA DIABETES

Pacientes con IDDM o NIDDM desarrollan a largo plazo complicaciones secundarias de la enfermedad. Estas incluyen las patologías microvasculares específicas de retina, riñón y complicaciones neurológicas (Ruderman y col., 1992), así como problemas macrovasculares de aterosclerosis oclusiva que afectan a corazón, cerebro y extremidades (Scheider y col., 1993). En NIDDM las complicaciones más frecuentes son la retinopatía y la angina, que afectan cada una de ellas a un 17% o más de los pacientes (Watkins y col., 1987). La esperanza de vida en enfermos de NIDDM se reduce de 5 a 10 años en comparación con la población general.

En pacientes diabéticos es muy frecuente el desarrollo de retinopatía proliferativa. Esta se caracteriza por el crecimiento anormal de vasos sanguíneos a través de la retina, provocando una pérdida de visión, que en ocasiones, es completa. Los vasos de la retina no crecen tras el nacimiento. Toda neovascularización postnatal en este tejido es, por tanto, patológica. Los nuevos vasos son frágiles, permiten la extravasación de componentes sanguíneos y, frecuentemente, se rompen, produciendo hemorragias en la cavidad vítrea. Fibroblastos y células de la glia también proliferan en la proximidad de los nuevos vasos, a medida que progresa la enfermedad. En casos avanzados, se produce así mismo neovascularización en la superficie del iris y en el ángulo de la cámara anterior. En consecuencia, se dificulta la filtración del humor vítreo y se incrementa la presión intraocular. Todos estos procesos son causa importante de ceguera (Kohner y col., 1994).

Las cataratas son también complicaciones importantes de la diabetes mellitus. Se producen con una frecuencia 12 veces superior en individuos diabéticos que en la población general (Harding y col., 1993). El tratamiento definitivo de las cataratas es siempre quirúrgico. Aproximadamente, el 10% de los pacientes operados por cataratas corresponde a diabéticos, la mayoría de los cuales son enfermos de NIDDM (Smith, 1991). Existe correlación entre la aparición de cataratas, la edad de los pacientes y la duración de la enfermedad. Así mismo, algunos estudios describen una incidencia ligeramente superior en mujeres que en hombres (Harding y col., 1993). La operación de cataratas está indicada en

los casos de pérdida importante de visión y para facilitar el diagnóstico y tratamiento de la retinopatía. Sin embargo, los pacientes con retinopatía tienen peor prognosis (Pollack y col., 1991).

Estudios epidemiológicos y en modelos animales de diabetes implican la hiperglucemia en el desarrollo de las complicaciones secundarias de la enfermedad. Durante décadas se ha postulado que la glucosa tiene un efecto tóxico en los tejidos. Diversos estudios que comparan la terapia intensiva con insulina en diabéticos de tipo I con el tratamiento estándar, muestran que en el primer caso, en que el paciente está expuesto en menor grado a la hiperglucemia, se produce un retraso de la aparición de complicaciones secundarias. Además, la progresión de la retinopatía, nefropatía y neuropatía se ralentiza. Otros factores que se han implicado en el desarrollo de estas alteraciones secundarias, son la hiperinsulinemia, la resistencia a la insulina, asociadas a la hipertensión y la hipoxia tisular (Ruderman y col., 1992).

2.2. ANIMALES TRANSGÉNICOS Y DIABETES

Los primeros estudios de diabetes que se llevaron a cabo utilizando animales transgénicos se centraron fundamentalmente en crear modelos en ratón de diabetes insulino dependiente. El principal objetivo de estas investigaciones era el de dilucidar los diferentes mecanismos que dan origen a esta enfermedad, interesándose especialmente en los fenómenos de autoinmunidad y respuesta antiviral. En este campo se han realizado numerosos estudios sobreexpresando en las células β del páncreas los complejos mayores de histocompatibilidad, MHC I y II, interferón gamma o proteínas virales. En la mayoría de los casos los animales desarrollan una diabetes tipo I por destrucción de las células β , aunque la etiopatogenia varía en cada caso. Estos modelos son una muestra del componente no genético de la etiología de la enfermedad y una herramienta valiosa para estudiar los mecanismos implicados de la respuesta inmunitaria (Lipes, y Eisenbarth, 1990; Sarvetnick, 1990).

Sin embargo, hasta hace muy poco prácticamente no se habían realizado estudios con animales transgénicos que se interesaran por la fisiopatología de la célula β . En 1989 Epstein y col. desarrollaron un modelo animal de sobreexpresión de calmodulina en estas células. Estos animales, con niveles de calmodulina cinco veces superiores a lo normal, desarrollaban una diabetes severa poco tiempo después del nacimiento. Actualmente se ha incrementado el interés de aplicar la tecnología de animales transgénicos al estudio del complejo conjunto de patologías que conforman la NIDDM. Basándose en las distintas alteraciones de la célula β que se han hipotetizado como causa de diabetes, se han desarrollado diversos modelos de animales transgénicos. En nuestro laboratorio se ha obtenido un animal que sobreexpresa un mRNA antisentido para el transportador de glucosa GLUT-2 en las células β pancreáticas. La disminución del transporte de glucosa en estas células conduce a la reducción de la secreción de insulina y como resultado estos animales son hiperglucémicos y resistentes a la

hormona (Valera y col., 1994b). Una disminución de la actividad glucoquinasa de las células β también conduce a una menor secreción de insulina en animales transgénicos. Sin embargo, en estos animales a los tres meses de edad no se observan variaciones en los niveles de insulina y glucosa sérica (Efrat y col., 1994).

La amilina es una hormona secretada en pequeñas cantidades en la célula β que se ha implicado en el desarrollo de la enfermedad. Es el componente mayoritario de los acúmulos de amiloide que se encuentran en los islotes de pacientes con NIDDM. Esta alteración se asocia a destrucción de célula β y se le atribuye un posible papel de deterioro de la función del islote. Diferentes grupos han obtenido animales transgénicos que sobreexpresan amilina en células β . En estos animales no se observa hiperglucemia ni hiperinsulinemia (Fox y col., 1993; Hoppener y col., 1993). De Koning y col. obtienen resultados similares, si bien, demuestran la formación de depósitos de fibras de amiloide humano cuando los islotes son incubados a elevadas concentraciones de glucosa. En estas condiciones los islotes de animales transgénicos que sobreexpresan amilina (humana o de rata) no presentan alteración de secreción de insulina (De Koning y col., 1994).

Por otra parte, diversos grupos han obtenido animales transgénicos que expresan el gen de la insulina humana en células β del páncreas. Sin embargo, los niveles de insulina sérica no se incrementan ya que disminuye la expresión de la hormona endógena (Buchini y col., 1986; Selden y col., 1986a). Por el contrario, Marban y col. han generado una línea de ratones transgénicos que al haber incorporado 30 copias del gen de la insulina humana, presentan una elevación de la insulinemia de dos a cuatro veces. Estos animales desarrollan con la edad intolerancia a la glucosa e hiperlipidemia (Marban y col., 1989).

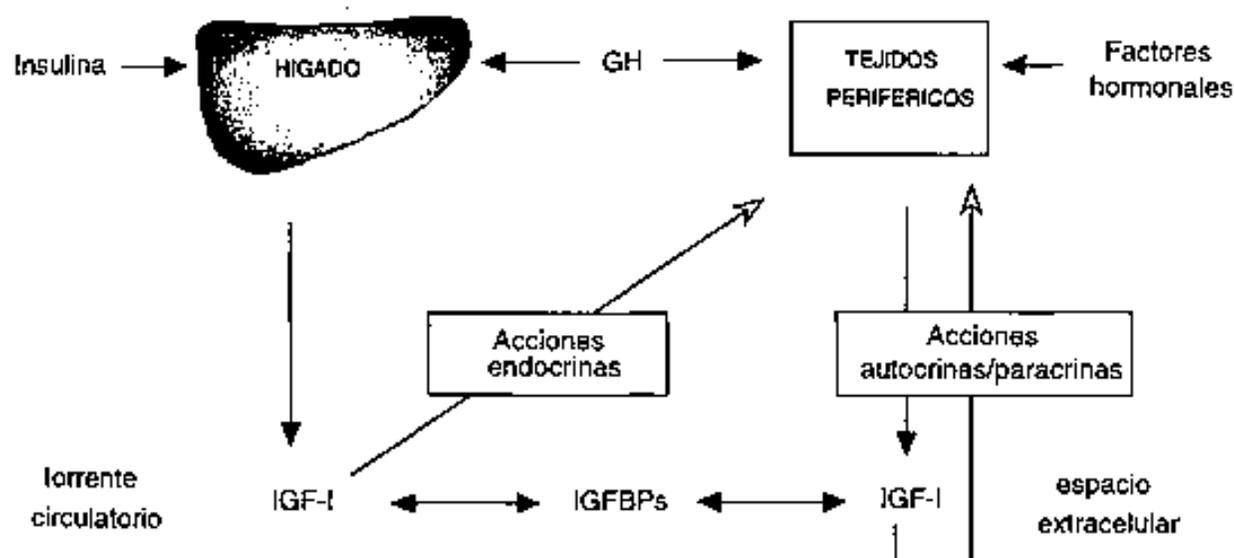
Recientemente se han obtenido animales modelos de resistencia a la insulina mediante la sobreexpresión de genes en músculo e hígado. Un incremento del transporte basal de glucosa por sobreexpresión del transportador GLUT-1 en músculo esquelético conduce a la ausencia de respuesta de GLUT-4 a la insulina y otras señales activadoras de este transportador (Gulve y col., 1994). Mientras, que la expresión de un receptor mutado de la insulina deficiente en actividad tirosina quinasa en este tejido produce un incremento de dos veces de la insulina sérica y una ligera hiperglucemia en animales transgénicos (Chang y col., 1994). Por otro lado, un aumento de la producción hepática de glucosa por sobreexpresión de un minigen de la PEPCK también es causa de hiperinsulinemia (Valera y col., 1994). Estos estudios indican que tanto a nivel de islotes pancreáticos como en tejidos periféricos, una alteración de los mecanismos implicados en el control de la homeostasis de la glucosa puede conducir a diabetes mellitus.

3. FACTORES DE CRECIMIENTO SEMEJANTES A LA INSULINA

Los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGFs) pertenecen a una familia de péptidos que comprende la insulina, el IGF-I, el IGF-II y la relaxina. A todos ellos se les atribuye un antecesor común a partir del cual han evolucionado separadamente, lo que ha dado origen a diferencias en los patrones de regulación y a la adquisición de nuevas acciones biológicas. La variedad de patrones de regulación parece ser consecuencia directa de alteraciones genéticas de los elementos reguladores, mientras las acciones biológicas se relacionan con la distinta afinidad por diferentes receptores de membrana. A nivel molecular, la semejanza entre los péptidos, y a su vez entre los receptores de insulina e IGF-I, permite que muestren reactividad cruzada. De esta forma, altas concentraciones de insulina inhiben la interacción de los IGFs con el receptor de IGF-I y viceversa. A nivel de acciones biológicas, se han descrito efectos de tipo insulínico sobre metabolismo de carbohidratos, síntesis de lípidos y proteínas, producidos por los IGFs. Así como efectos de proliferación celular propios de los IGFs llevados a cabo por la insulina en determinados tipos celulares.

Los animales presentan tras el nacimiento unos niveles séricos de IGF-I que son dependientes de hormona de crecimiento (GH). Su incremento en la etapa del crecimiento es imprescindible para que éste se produzca con normalidad. Por lo contrario, el IGF-II tiene una regulación independiente de GH. El IGF-II parece más bien jugar un papel destacado en el crecimiento y diferenciación de los tejidos en la etapa fetal.

El hígado es el principal órgano productor de los IGFs en el adulto. Secreta los factores al torrente circulatorio, desde donde son distribuidos al resto del organismo para llevar a cabo sus acciones endocrinas. Sin embargo, estos factores también se producen en otros tejidos donde desarrollan acciones autocrinas y paracrinas. Acciones que se asemejan a las de otros factores de crecimiento e incluyen proliferación celular e inducción y mantenimiento de la diferenciación. Por tanto, los IGFs tienen un doble comportamiento. Por un lado, actúan como promotores de crecimiento específico de órgano y regeneración local. Por otro, contribuyen al mantenimiento de un crecimiento equilibrado y de una homeostasis energética. No se conocen, sin embargo, en profundidad los mecanismos moleculares que explican esta dualidad de acciones (Esquema VI).



Esquema VI. Regulación y acción del IGF-I. El IGF-I endocrino es producido en hígado y secretado al torrente circulatorio para ser distribuido a los tejidos. El principal estimulador hormonal de la síntesis de IGFs es la hormona de crecimiento (GH). Las proteínas de unión a IGFs (IGFBPs) alargan la vida media de los factores séricos y regulan su acceso a los tejidos. Los IGFs son producidos en gran número de tejidos distintos al hígado, donde llevan a cabo acciones autocrinas y paracrinas.

3.1. ESTRUCTURA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SEMEJANTES A LA INSULINA

La estructura de la insulina fue determinada por Frederick Sanger en 1953. Está formada por dos cadenas, la cadena A de 21 aminoácidos y la cadena B de 30 residuos. Ambas están unidas covalentemente mediante dos enlaces disulfuro (Brown y col., 1955). La estructura de los IGFs es muy similar, aunque están formados por una única cadena que conserva el péptido C de unión que se pierde en el procesamiento de la insulina. Poseen, además, un dominio D en la región carboxiterminal que no presenta la insulina. La alta homología que comparten permite suponer una estructura terciaria muy próxima a la insulina manteniendo el núcleo hidrofóbico y los puentes disulfuro (Blundell y col., 1978, 1983; Honegger, 1985).

El IGF-I está formado por 70 aminoácidos con un peso molecular de 7,6 kDa, mientras el IGF-II posee 63 residuos y un peso molecular de 7,4 kDa (Van den Brande y col., 1990). Sus secuencias muestran alta homología entre especies, especialmente entre los

mamíferos. Así, el IGF-I humano es idéntico al porcino, vacuno y ovino y sólo difiere en 4 residuos del murino (Shimatsu y Rotwein, 1987; Francis y col., 1989; Tavakkol y col., 1988; Tamura y col., 1989). La secuencia génica del IGF-I también presenta un alto grado de conservación entre especies, especialmente para la región que se corresponde con el dominio B de la proteína. En la región 5' no traducida se observa así mismo homología (Ward y Ellis, 1992).

La expresión génica de los IGFs y su regulación son muy complejas. Los estudios se han centrado hasta el momento en el gen humano y de rata de ambos IGFs. La transcripción de estos genes da lugar en estas especies a una serie de mRNAs, que a su vez se traducen a diversas proteínas. Debido a la multiplicidad de promotores y señales de poliadenilación, se producen varios transcritos con diferentes regiones 5' y 3' no traducidas. Además, se obtienen diversas proteínas por procesamiento alternativo de los transcritos. Estas proteínas son, sin embargo, pre-prohormonas y sufren un proceso de maduración posterior para dar lugar a un único factor activo. El gen del IGF-I de rata, por ejemplo, abarca 80 kb y contiene 6 exones. Los dos primeros codifican para secuencias 5' no traducidas y secuencias aminotermiales del IGF-I alternativas (Hall y col., 1992). Además la transcripción del gen se inicia en dos elementos distintos del promotor en una región anterior a los exones 1 y 2 (Adamo y col., 1993). Una mayor heterogeneidad se obtiene del procesamiento alternativo del último exón que da lugar a dos mRNAs precursores de diferente longitud denominados IGF-Ia e IGF-Ib (hombre: Jansen y col., 1983; Rotwein, 1986; rata: Lowe y col., 1988 y ratón: Bell y col., 1986). Así como, del uso de señales alternativas de poliadenilación tras el exón 6 (Hall y col., 1992).

Se ha detectado mRNA de IGF-I en embriones después de la implantación y en tejidos fetales de origen mesenquimatoso (Lund y col., 1986, Beck y col., 1987). Pero son los tejidos de animales adultos los que más expresan, observándose la mayor concentración de transcrito específico de IGF-I en el hígado. En este tejido la expresión está regulada por la hormona de crecimiento (Mathews y col., 1986), mientras en otros tejidos se regula, al menos en parte, de forma independiente (D'Ercolo y col., 1984; Beck y col., 1988; Hynes y col., 1987 y Roberts y col., 1987). Por tanto, los patrones de expresión tisular observados para el IGF-I concuerdan con el papel que se le atribuye, su doble función endocrina y autocrina/paracrina.

3.2. RECEPTORES DE LOS IGFs Y MECANISMOS DE TRANSDUCCION DE SEÑAL

Los IGFs se caracterizan por tener acciones semejantes a la insulina. Los primeros estudios de unión competitiva demostraron que, si bien, el IGF-I y el IGF-II se unen débilmente al receptor de esta hormona, ambos poseen sus propios receptores de alta afinidad

(Hintz y col., 1972; Marshal y col., 1974 y Zapf y col., 1978).

El receptor de la insulina pertenece a una familia de receptores con actividad tirosina quinasa y presenta una estructura de cuatro subunidades unidas por puentes disulfuro. La estructura del receptor del IGF-I, también denominado de tipo 1, es muy similar (Massagué y Czech, 1982). Este consta de dos subunidades α de 135.000 y dos subunidades β de 95.000 kDa, unidas todas ellas por puentes disulfuro. La subunidad α está situada en su totalidad en el espacio extracelular, mientras la subunidad β está anclada en la membrana. Los receptores de IGF-I e insulina son los únicos de su familia con una estructura en forma de dímeros. El resto de receptores de este grupo tienen estructura monomérica y, por regla general, dimerizan cuando son activados por el ligando (Van Obberghen, 1994). Por otro lado, los receptores de tipo 2, que se unen al IGF-II con alta afinidad, no están estructuralmente relacionados con el receptor de la insulina, ni presentan actividad tirosina quinasa. Su función no es clara, pero se ha demostrado que este receptor es idéntico al receptor de la manosa-6-fosfato (Roth y col., 1988).

La similitud entre IGF-I, IGF-II y la insulina permite que se produzca reactividad cruzada con los tres receptores. El IGF-I se une al receptor de tipo 1 con una afinidad de 2 a 3 veces mayor que el IGF-II y unas 100 veces mayor que la insulina. Ambos IGFs se unen al receptor de la insulina, si bien, con mucha menor afinidad que la propia insulina. Sin embargo, el IGF-II se une con mayor afinidad que el IGF-I a este receptor. Finalmente, el IGF-II es el que se une con mayor afinidad al receptor de tipo 2, el IGF-I se une con 100 veces menos afinidad y no se detecta unión de la insulina. Los estudios realizados hasta el momento indican que este receptor no está involucrado en la mediación de las acciones propiamente conocidas de los IGFs de tipo metabólico y de control de la proliferación y diferenciación, que se atribuyen al receptor de tipo 1 (Massagué y Czech, 1982).

De este último receptor se ha descrito que es sintetizado como una sola molécula precursora de 180 kDa que contiene una subunidad α y una β , y que posteriormente sufre modificaciones postraduccionales que incluyen glicosilación, dimerización, formación de puentes disulfuro y proteólisis (Jacobs y col., 1983; Duronio y col., 1986, 1988). Esta organización se ratifica a partir de la secuencia nucleotídica del cDNA y del DNA genómico humano (Ullrich, 1986; Abbot y col., 1992) y corrobora la similitud observada con el receptor de la insulina. La semejanza en la organización de ambos genes sugiere un origen evolutivo próximo. La subunidad α contiene una única región rica en cisteínas, que es característica de los dos receptores. Gustafson y Rutter, han demostrado mediante la obtención de receptores quiméricos de IGF-I e insulina, que esta región es la que determina la especificidad de unión de los ligandos al receptor. Sin embargo, la unión de alta afinidad de la insulina por su receptor involucra regiones adicionales en los extremos amino y carboxiterminal (Gustafson y Rutter, 1990). En la subunidad β , los receptores de IGF-I e insulina presentan los dominios transmembrana y tirosina quinasa. Entre estos dos dominios

se sitúa el motivo NPXY, elemento esencial para la eficiente internalización de ambos receptores (Hsu y col., 1994). En el dominio quinasa es donde presentan mayor homología, con un 84% de identidad. Por el contrario, en la porción carboxi-terminal de la subunidad β la homología disminuye drásticamente. Se sugiere que, al menos en parte, es causa de las diferencias de actividad biológica de ambos receptores (Tartare y col., 1994). Por otro lado, se ha demostrado la existencia de dos formas del receptor de IGF-I humano, obtenidas por procesamiento alternativo de la región 5' del exón 14, que presentan claras diferencias en la cinética de internalización y en la actividad biológica (Condorelli y col., 1994).

El estudio de los mecanismos por los que actúan los receptores de insulina e IGF-I se centró en un inicio en el dominio quinasa. El receptor de la insulina es mejor conocido, pero los datos que se han ido obteniendo del receptor de IGF-I sugieren que existe un gran parecido entre ambos. La unión de IGF-I produce una rápida autofosforilación del dominio quinasa (Jacobs y Cuatrecasas, 1986; Rubin y col., 1983) y una activación del mismo que se acompaña de una respuesta de tipo insulínico (estimulación de la síntesis de glucógeno e incorporación de timidina) (Sasaki y col., 1985; Steele-Perkins, 1988). Además, se ha demostrado en células con los dos tipos de receptores, una íntima relación entre ambos. Los receptores de insulina estimulados por la hormona son capaces de fosforilar y activar al propio receptor del IGF-I, e incluso se ha identificado la existencia de heterodímeros de los dos receptores (Tartare y col., 1991; Soos y Siddle, 1989). Los mecanismos del proceso de transducción de señal a través de la vía de la MAP quinasa que se conocen hasta el momento de la insulina, también son compartidos por el IGF-I actuando a través del receptor de IGF de tipo 1. Tras la autofosforilación, inducida por la unión del ligando, del receptor, otras proteínas celulares pueden ser fosforiladas en tirosina por los receptores de la insulina o el IGF-I. El IRS-1 (*Insulin Receptor Substrate-1*) es el principal sustrato de ambos receptores y su fosforilación activa proteínas con dominios SH2. La fosfatidilinositol 3-quinasa se activa por este mecanismo y puede mediar los efectos del IGF-I a través de la fosforilación de fosfatidilinosítoles (Ruderman y col., 1990). La vía de p21^{ras} también se activa por fosforilación de IRS-1 (Jhun y col., 1994), iniciándose una cascada de fosforilaciones en serina y treonina. En esta cascada participan la Map2 quinasa y la S6 quinasa ribosomal, que se activan en células tratadas con uno u otro efector (Hoshi y col., 1988; Sturgill y col., 1988). Por tanto, parece ser que IGF-I e insulina comparten esta vía de transducción de señal. Se ha propuesto que las diferencias de acción de ambos factores son debidas al distinto grado de activación de la cascada de fosfo-defosforilación que conduce a la respuesta mitogénica y metabólica (Tartare y col., 1994). Sin embargo, se requieren más estudios para poder conocer las bases moleculares que dan origen a las distintas acciones de la insulina y el IGF-I (Esquema VII).

Otra vía de acción de la insulina es la de regulación de los niveles de cAMP. Desde hace casi 30 años se conoce que la insulina disminuye la concentración de este segundo mensajero en diferentes tipos celulares. Los mecanismos mediante los que actúa son

3.3. PROTEINAS DE UNION A IGFs (IGFBPs)

Los IGFs prácticamente siempre se detectan unidos a proteínas de alta afinidad (IGFBPs). Este hecho constituye una diferencia fundamental entre los IGFs y la insulina. Hasta el momento, se han identificado 6 proteínas diferentes que van de la IGFBP-1 a la IGFBP-6 (Drop y Hintz, 1989). Las primeras en ser descubiertas fueron las principales proteínas de unión séricas. Por cromatografía se detectaron dos fracciones que contenían actividad IGF, una menor de 50.000 kDa y otra mayor de 150.000 kDa (Koumans y Daughaday, 1963; Barreca y Minuto, 1989). A diferencia de los receptores de IGFs, ninguno de estos complejos se unía a insulina (Rechler y col., 1980).

En cuanto a la caracterización de estas proteínas, han sido purificadas y se han clonado y secuenciado sus genes. La más abundante es la IGFBP-3 (150 kDa), que se corresponde con el complejo mayor del suero. Le sigue la IGFBP-1 (50 kDa), que se corresponde con el complejo menor, con una concentración sérica 100 veces menor. El complejo de 150 kDa es el único que contiene dos subunidades (Baxter y Martin, 1986; Baxter, 1988). De las 4 IGFBPs más estudiadas (1, 2, 3 y 6), cabe destacar la conservación de 18 cisteínas que se suponen fundamentales para establecer su estructura terciaria. En cuanto a su afinidad por los IGFs, la más afin es la BP-3 ($K_D = 2,1$ nM IGF-I), seguida a continuación por la BP-1 ($K_D = 6,5$ nM IGF-I). Ambas se unen casi por igual a IGF-I e IGF-II, mientras BP-2 y BP-6 se unen principalmente al IGF-II (Forbes y col., 1988).

A las IGFBPs se les atribuyen funciones de alargar la vida media de los factores en el torrente circulatorio, u otros compartimentos, limitar el acceso a los receptores de membrana, y/o dirigirlos a los lugares de acción. En cierto modo, la síntesis de IGFBP-3 se comporta de forma paralela a la de los IGFs. Por un lado, se sintetiza en gran cantidad a nivel hepático, para ser posteriormente excretada al torrente circulatorio y prolongar de esta forma la vida media de los IGFs en suero. Por otro, se produce a nivel tisular regulando la función autocrina y paracrina de los IGFs. Se ha observado que prácticamente todas las células de mamífero sintetizan al menos un tipo, si no más, de las 6 IGFBPs que se han identificado (McCusker y col., 1992).

3.4. REGULACION HORMONAL DE LOS IGFs

La concentración sérica de IGF-I es dependiente de la edad tanto en hombre como en animales. El nivel de IGF-I sérico es bajo en el período anterior al nacimiento y va en aumento durante el crecimiento hasta alcanzar un pico en la pubertad. En los adultos los niveles se estabilizan y disminuyen en los ancianos (Hall y Sara, 1984). Este patrón se corresponde con la producción de hormona de crecimiento en las distintas etapas de la vida. La estimulación de la síntesis del factor por GH se asocia a un incremento de la transcripción

del gen de IGF-I (Bichell y col., 1992). En animales hipofisectomizados la administración de GH conduce a un incremento de mRNA de IGF-I distinto para cada órgano (músculo esquelético, hígado y riñón), que se correlaciona con el aumento de peso de cada uno de ellos (Murphy y col., 1987).

Por otro lado, los niveles más elevados de IGF-I sérico, de dos a diez veces los valores normales, se han observado en pacientes que padecen acromegalia, enfermedad en que se produce un exceso de hormona de crecimiento (Clemmons y col., 1979; Hall y Sara, 1984). Por el contrario, las deficiencias de GH se asocian a bajos niveles de IGF-I, si bien, nunca se observa una carencia total del factor (Underwood y col., 1980; Hall y Sara, 1984). Los niveles más bajos de IGF-I se han descrito en los casos de enanismo de Laron, en los que se describe un defecto de receptores de GH (Zapf y col., 1981a).

En la diabetes mellitus dependiente de insulina también se produce una disminución del IGF-I sérico, que se restablece con el tratamiento con insulina (Lanes y col., 1985; Hall y col., 1989). En animales diabéticos por estreptozotocina se observa una disminución de la expresión de IGF-I en diversos tejidos (Murphy, 1988; Leaman y col., 1990). Además, se ha descrito que muchos casos de diabetes tipo II presentan niveles reducidos de este factor en suero (Mercado y col., 1992). En experimentos en hepatocitos en cultivo primario la adición de insulina y/o hormona de crecimiento conduce a un incremento en la expresión de IGF-I. Ambas hormonas estimulan la expresión del factor de forma independiente, produciendo efectos aditivos (Böni-Schnetzler y col., 1991).

El estado nutricional también es un importante factor de regulación de la síntesis de IGF-I. En estados de desnutrición sus niveles están disminuidos (Grant y col., 1973; Hintz y col., 1978; Hall y Sara, 1984). El ayuno produce una disminución del IGF-I sérico que se restablece con una dieta equilibrada. Una dieta isocalórica baja en proteínas retrasa la recuperación, mientras que una dieta baja en proteínas e hipocalórica conduce a una reducción aún mayor. Por tanto, los niveles séricos de IGF-I se correlacionan positivamente con el balance nitrogenado (Isley y col., 1983; Clemmons, 1985). Los mecanismos que producen esta regulación no son bien conocidos, pero es claro que son independientes de la hormona de crecimiento y de la insulina. En el ayuno, al igual que en IDDM, la administración de GH no restaura los niveles de IGF-I (Meriméc y col., 1982). En ratas diabéticas alimentadas con dieta baja en proteínas la infusión de insulina no recupera los niveles de IGF-I (Maiter y col., 1989).

Además de la hormona de crecimiento y la insulina, otras hormonas regulan la síntesis de IGF-I. En esta regulación de la producción de IGFs se diferencian las dos facetas endocrina y paracrina, representadas respectivamente por la producción hepática o extrahepática del factor. Los estrógenos tienen un efecto supresor de la síntesis hepática de IGF-I (Hall y Sara, 1984), mientras la prolactina tiene un efecto estimulador en este órgano

(Murphy y col., 1988). Los glucocorticoides parecen disminuir los niveles de mRNA de IGF-I en diversos tejidos y atenuar la inducción por GH (Luo y Murphy, 1989). Muchos otros factores se han descrito como reguladores de la síntesis de IGFs de función paracrina. En primer lugar, Clemmons y Shaw demostraron, que además de la GH, el PDGF y el FGF estimulan la producción de IGF-I en fibroblastos en cultivo (Clemmons y Shaw, 1983). La parathormona incrementa notablemente el IGF-I producido en osteoblastos en cultivo (McCarthy y col., 1989). En las gónadas, la síntesis de IGF-I en las células de la granulosa y de Sertoli es estimulada por FSH y LH (Maruo y col., 1988; Tres y col., 1986). Por tanto, en los tejidos donde el IGF-I tiene una función paracrina específica, la regulación de su biosíntesis también se produce de forma acorde con su función. El incremento de IGF-I inmunoreactivo que se detecta en tejidos en regeneración (tejido nervioso, músculo esquelético, riñón, células endoteliales), también es consecuencia de una respuesta a una señal local (Sara y Hall, 1990).

3.5. ACCIONES BIOLÓGICAS DE LOS IGFs

El estudio de las acciones biológicas de los IGFs ha estado siempre ligado a las de hormona de crecimiento e insulina, con la dificultad de discernir qué efectos eran producidos propiamente por cada hormona y a través de qué receptor. En estos últimos años, las técnicas de DNA recombinante han permitido obtener las hormonas altamente purificadas y en cantidad suficiente para llevar a cabo estos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. En el primer caso se han empleado cultivos celulares de diversas líneas para conocer sus efectos sobre la proliferación/diferenciación o sobre el metabolismo basándose en: (a) determinación de los receptores presentes en cada tipo celular, (b) obtención de la curva dosis-respuesta y (c) bloqueo selectivo del receptor con anticuerpos específicos para conocer cuál es el mediador de la respuesta (Rechler y Nissley, 1985). Por otro lado, los estudios *in vivo* se han realizado mediante la administración de los factores, de forma puntual o a largo plazo, a hombre o animales (Froesch, 1994). Finalmente, gracias a la obtención de animales transgénicos se han podido crear modelos vivos con alteraciones del patrón hormonal y consecuentemente de sus efectos fisiológicos (Quaife y col., 1989).

3.5.1. Acciones semejantes a la insulina

La actividad de tipo insulínico presente en el suero estimada por bioensayo es mucho mayor de la explicable por los niveles circulantes de insulina determinados por inmunoensayo. Además, es sólo ligeramente suprimida por suero hiperinmune antiinsulina (Froesch y col., 1963). La contribución de los IGFs a la actividad total semejante a la insulina en suero es comparable a la de la propia insulina (Phillips y Vassilopoulou-Sellin, 1980). La administración de una carga intravenosa de IGF-I en individuos ayunados conduce a

hipoglucemia (Guler y col., 1987). El IGF-I produce este efecto mimetizando a la insulina en los tejidos diana de la hormona. Incrementa el transporte de glucosa y la oxidación del azúcar, inhibe la lipólisis y estimula la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas (Zapf y col., 1981b; Froesch y col., 1985). También, disminuye la producción hepática de glucosa. Sin embargo, estos efectos no se llevan a cabo con la misma potencia que la insulina (Widmer y col., 1985; Moxley y col., 1990). El IGF-II produce efectos agudos similares a los del IGF-I. Estimula la captación y metabolización de la glucosa e inhibe, con mayor potencia que el IGF-I, la liberación de glicérol de las células adiposas (Zapf y col., 1978). Los estudios *in vitro* con diferentes tipos celulares indican que estos efectos no son sólo mediados por el receptor de IGF-I. En el tejido adiposo se considera que estas acciones tienen lugar a través del propio receptor de insulina (Zapf y col., 1981b). Mientras en corazón y músculo esquelético, en que los IGFs son tan potentes como la insulina, se supone que actúan a través del receptor de IGF de tipo I (Froesch y col., 1985). En músculo esquelético el receptor de IGF-I se encuentra en proporción de un tercio de los de insulina (Zorzano y col., 1988).

Cuando el IGF-I se administra a sujetos normales de forma sostenida, en una dosis inferior a 10 $\mu\text{g}/\text{Kg P.V.}\cdot\text{h.}$, no conduce a hipoglucemia. En cambio, cuando se administra a pacientes con NIDDM disminuye los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol (Zenobi y col., 1992, 1993). Por estas acciones se le ha atribuido un valor terapéutico en condiciones de resistencia a la insulina como la diabetes tipo 2 (Froesch y Hussain, 1994).

3.5.2. Acciones promotoras del crecimiento y de proliferación celular

Además de actuar los IGFs como mediadores de la acción de la hormona de crecimiento, pueden desarrollar su actividad independientemente de la hormona. En experimentos *in vitro* en los que se mide la incorporación de timidina tritiada en ausencia de GH, se ha demostrado la capacidad del IGF-I y el IGF-II de inducir proliferación celular y replicación del DNA de diferentes tipos celulares. Esta acción es llevada a cabo a través del receptor de IGF de tipo I (Czech y col., 1984; Van Wyk y col., 1985). La insulina también puede mimetizar estos efectos, pero a concentraciones mucho mayores, compitiendo con el IGF-I por el mismo receptor (Conover y col., 1986). En conjunción con otros factores como el FGF o PDGF, iniciadores del ciclo celular, la acción mitótica de los IGFs es muy elevada. Se ha propuesto que los IGFs actúan como factores de progresión del ciclo celular a nivel de la fase de síntesis de DNA (Sara y Hall, 1990).

Por otro lado, los IGFs son potentes estimuladores de la diferenciación celular. Se ha descrito este efecto en numerosas líneas celulares, como mioblastos, osteoblastos, adipocitos y oligodendrocitos. También son inductores de la eritropoyesis y la granulopoyesis (Sara y Hall, 1990). En contraposición, se ha detectado la secreción de estos factores en numerosas líneas celulares tumorales (Schofield y Engstrom, 1992), y existen evidencias de que el IGF-I

está implicado en el crecimiento de las células transformadas (Massagué y col., 1985). Aunque no se puede afirmar que el IGF-I es causa de la progresión de estos tumores, al menos en el caso de las células de glioblastoma de rata se ha podido demostrar que el bloqueo de la expresión del factor conduce a regresión del tumor (Trojan y col., 1993).

Las acciones de estimulación de la proliferación y la diferenciación que se observan *in vitro* concuerdan con el papel de los IGFs de estimulación del crecimiento *in vivo*. En ratas adultas hipofisectomizadas, la administración de IGF-I incrementa el peso vivo y la incorporación de timidina en el cartílago (Schoenle y col., 1982). El IGF-II tiene un efecto promotor del crecimiento menor (Schoenle y col., 1985). En el período fetal y pocos días después del nacimiento, en ausencia de GH, el IGF-I también estimula el crecimiento (Phillips y col., 1988).

La insulina también tiene a altas concentraciones un efecto mitogénico. Este se produce probablemente a través del receptor de IGF-I (Froesch y col., 1985). A pesar de las similitudes entre la insulina y el IGF-I, estos tienen a través de sus propios receptores diferentes papeles fisiológicos. La primera está más involucrada en la regulación del metabolismo y el segundo en el crecimiento y desarrollo. Esto puede ser debido más a la distribución celular de sus receptores, que a diferencias fundamentales de su modo de acción. Aunque muchos tejidos expresan ambos receptores, se observa que los tejidos metabólicos como hígado y adiposo, presentan gran cantidad de receptores de insulina y muy pocos o ninguno de IGF-I. Mientras, por el contrario, los fibroblastos y las células β del páncreas contienen fundamentalmente receptores de tipo I (Flier y col., 1986; Van Schravendijk y col., 1990).

3.6. ACCIONES DEL IGF-I SOBRE LA FISIOLÓGIA DE LA CELULA β DEL PANCREAS

Aunque los estudios se han centrado hasta el momento en el papel del IGF-I endocrino en tejidos metabólicos como hígado, músculo y adiposo, numerosas evidencias indican que el IGF-I juega un papel paracrino y autocrino en páncreas. La expresión local de IGF-I en páncreas del animal adulto es elevada comparándola con otros tejidos. De hecho, ordenando los tejidos según niveles decrecientes de expresión, se sitúa en segundo lugar a continuación del hígado (Mathews y col., 1986). En el período de embriogénesis son detectados niveles de expresión del factor muy elevados en páncreas y cerebro, mientras que prácticamente no se produce transcrito en hígado (Serrano y col., 1990). Se demuestra la presencia de receptores de IGF de tipo I, no sólo en el tejido acinar, sino en células α y β de los islotes de Langerhans (Van Schravendijk y col., 1987). Smith y col. (1991) muestran, mediante la técnica de hibridación *in situ*, la presencia de mRNA de IGF-I en las células endoteliales, así como en zonas de regeneración, cuando el páncreas es sometido a pancreatectomía.

Sin embargo, el papel del IGF-I en células B es más controvertido. Los primeros trabajos realizados con islotes fetales de rata o explantes fetales, describían la secreción de IGF-I inmunoreactivo en el medio de cultivo. Incluso se demostró por inmunohistoquímica su presencia en las células B del páncreas (Romanus y col., 1985; Hill y col., 1987). Recientemente, mediante estudios de inmunohistoquímica llevados a cabo por el grupo de Reinecke y Sara en diversas especies mamíferas (hombre, perro y rata), se ha localizado la producción de IGFs en las células de los islotes pancreáticos. El IGF-I se produce únicamente en las células α productoras de glucagón, con excepción del hombre en que algunas células productoras de somatostatina también producen el factor. Por el contrario, la localización del IGF-II está restringida a las células B pancreáticas (Maake and Reinecke, 1993).

No se han realizado estudios, por el momento, que demuestren que el IGF-I producido en los islotes juega un papel *in vivo* regulando la secreción de insulina. Los estudios se han limitado a describir acciones del IGF-I en experimentos *in vitro*. Estas acciones son tanto a nivel de proliferación/diferenciación como funcionalidad. Así, se ha observado que añadiendo IGF-I al medio de cultivo de islotes fetales pancreáticos, se produce un enriquecimiento en células β y un aumento de la secreción de insulina (Eckhoff y col., 1991). En islotes en cultivo de animales adultos, el IGF-I conduce a un incremento de la secreción basal de insulina, así como de la secreción estimulada por glucosa. Este efecto no se observa cuando se emplea, a mucha mayor concentración, hormona de crecimiento (Clark y Chick, 1990). Su presencia también aumenta el porcentaje de supervivencia de las células endocrinas, β y no- β . Así como, incrementa el contenido de insulina de las primeras. La GH produce este efecto por otra vía, puesto que sus efectos son aditivos (Ling y col., 1994). Las concentraciones de IGF-I que conducen a estos efectos son muy bajas, de 2 a 5 ng/ml, mientras las dosis necesarias de GH son de 1 a 2 μ g/ml (Clark y Chick, 1990; Ling y col., 1994).

Estudios realizados en animales sólo atribuyen al IGF-I el papel de hormona sérica. Estos describen un efecto claramente inhibitorio de la secreción de insulina. Cuando se somete a hombre y animales a infusiones de IGF-I, se observa un descenso de la insulina plasmática que es independiente de los niveles de glucemia (De Zegher y col., 1988; Guler y col., 1989). Los animales transgénicos que sobreexpresan IGF-I en hígado presentan un incremento de IGF-I sérico y en consecuencia, una reducción de la insulinemia (Quaife y col., 1989). En páncreas perfundido de rata la infusión de IGF-I a concentraciones fisiológicas produce una marcada inhibición de la secreción de insulina inducida por glucosa, mientras que el IGF-II tiene un efecto menor. La magnitud de la inhibición es dependiente de la concentración de glucosa. Además, el nivel de insulina revierte cuando finaliza la infusión de IGF-I. En estas condiciones ni el IGF-I, ni el IGF-II, tienen efecto sobre la secreción de glucagón (Leahy y Vandekerkhove, 1990).

Esta supresión de la secreción de insulina viene seguramente mediada por los

receptores de IGF de tipo 1. La misma insulina a concentraciones mucho mayores que las del IGF-I es capaz de inhibir parcialmente su secreción en las células B. Van Schravendijk y col. han detectado la presencia en estas células de receptores de IGF-I y no de receptores de insulina. Se ha propuesto que la insulina, a concentraciones que sobrepasan los niveles circulantes normales, puede tener un mecanismo de retroalimentación negativa utilizando la vía de acción del IGF-I (Van Schravendijk y col., 1990). De este modo, el IGF-I, y en menor grado la propia insulina, ejercerían un papel de control de la homeostasis de carbohidratos a través de la célula B.

PARTE II: HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Los niveles de glucosa sanguínea se mantienen en mamíferos entre márgenes muy estrechos gracias a la acción concertada en los tejidos de las hormonas pancreáticas insulina y glucagón. La alteración de la síntesis y secreción de insulina conduce a graves problemas metabólicos y a diabetes mellitus. La diabetes es una enfermedad de gran incidencia y repercusión a nivel mundial. Por tanto, es de gran importancia conocer los mecanismos de regulación de la respuesta insulínica para poder, en último término, conocer las causas de la enfermedad y así, poder desarrollar aproximaciones terapéuticas.

Además de la glucosa y otros nutrientes, numerosos factores hormonales y nerviosos regulan la biosíntesis y secreción de la hormona por las células β del páncreas (Docherty y Clark, 1994). El glucagón, producido en las células α pancreáticas, estimula la síntesis y secreción de insulina mediante la activación de la adenilato ciclasa, que incrementa los niveles intracelulares de cAMP (Lu y col., 1993). La somatostatina, producida en las células δ , produce el efecto contrario al inhibir la adenilato ciclasa (Goke y col., 1989).

Recientemente, se ha descrito la presencia de IGF-I inmunoreactivo en las células α (Maake y Reinecke, 1993). Anteriormente, se había demostrado la presencia de receptores de IGF-I en las células β del páncreas (Van Schravendijk y col., 1990). Por otra parte, se había observado mediante experimentos *in vitro* en páncreas perfundido de rata, que el IGF-I era un potente inhibidor de la secreción de insulina (Leahy y Vanderkerkhove, 1990). Además, la infusión del factor provoca una reducción de la insulinemia en hombre y animales (De Zegher y col., 1988; Guler y col., 1989; Jacob y col., 1989). Sin embargo, otros estudios indicaban que el IGF-I en proislotes pancreáticos en cultivo producía un enriquecimiento de células β y un incremento de la secreción de insulina (Eckhoff y col., 1991). Las diferentes investigaciones realizadas indican que el IGF-I puede tener un papel modulador de la secreción de insulina *in vivo*.

Por otra parte, el IGF-I se ha asociado con el desarrollo de diversas complicaciones secundarias de la diabetes. Se ha descrito una reducción del IGF-I sérico en pacientes con IDDM y NIDDM. Sin embargo, se ha observado un aumento de IGF-I en órganos que presentan complicaciones microvasculares como ojo o riñón (Bach y Rechler, 1992).

Por otro lado, los mecanismos de acción del IGF-I a través del receptor de IGF de tipo I parecen ser muy semejantes a los de la insulina a través de su propio receptor. Las similitudes se observan tanto en la estructura de ambos receptores, como en los mecanismos de transducción de señal (Van Obberghen, 1994). La insulina conduce a una disminución de los niveles intracelulares de cAMP en los tejidos, contrarrestando de este modo la acción del glucagón. Probablemente, el IGF-I puede ejercer este mismo efecto. Así, se ha descrito que este factor contrarresta la acción de la parathormona en las células óseas mediante una disminución de los niveles del nucleótido (Goad y Tashjian, 1993).

La hipótesis inicial de este trabajo estaba centrada en que la producción de IGF-I en los islotes pancreáticos podría tener una acción paracrina importante de regulación de la secreción de insulina. Esta acción la podría llevar a cabo contrarrestando la acción del glucagón mediante la regulación de los niveles de cAMP. Así pues, un incremento de la producción de IGF-I podría tener un papel potencial en la patogenia de la diabetes mellitus. A fin de averiguar cuál era el papel del IGF-I en la regulación de la secreción de insulina, nos planteamos la obtención de un modelo de animal transgénico que sobreexpresara IGF-I específicamente en las células β del páncreas. Este modelo animal nos permitiría analizar tanto las bases de la acción del factor, como la repercusión que puede tener su desregulación en el desarrollo de la diabetes mellitus.

Así pues, los objetivos concretos de este trabajo fueron:

- 1- Obtención de ratones transgénicos que expresen de forma regulada IGF-I en células β del páncreas mediante microinyección del gen quimérico RIP/IGF-I.
- 2- Estudio de los parámetros séricos de los ratones transgénicos que expresen el gen quimérico RIP/IGF-I.
- 3- Estudio del peso corporal y de los órganos y análisis morfométrico del páncreas de los ratones transgénicos.
- 4- Estudio de la regulación de la síntesis y secreción de insulina en ratones transgénicos que expresen el gen quimérico RIP/IGF-I.
- 5- Estudio del metabolismo hepático de carbohidratos en ratones transgénicos que expresen el gen quimérico RIP/IGF-I.
- 6- Estudio de las alteraciones oculares de los ratones transgénicos.

PARTE II: RESULTADOS

1. RATONES TRANSGENICOS QUE EXPRESAN EL GEN DEL IGF-I EN CELULAS BETA DEL PANCREAS

Con el fin de estudiar la función y el mecanismo de acción del IGF-I producido localmente en los islotes pancreáticos, se obtuvo un modelo de animal transgénico que sobreexpresaba IGF-I en células B del páncreas, bajo el control del promotor de la insulina.

1.1. OBTENCION DE RATONES TRANSGENICOS QUE EXPRESAN EL GEN QUIMERICO RIP/IGF-I

1.1.1. Construcción del gen quimérico RIP/IGF-I

El gen quimérico RIP/IGF-I está formado por la región promotora del gen de la insulina de rata I (RIP, -507/+3) fusionado a un fragmento *Bam*HI/*Xho*I del gen de la β -globina de conejo, al que se le ha introducido el cDNA del IGF-I murino (Fig. 1). La porción del gen de la β -globina, que comprende el final del segundo exón, el segundo intrón, el tercer exón y la región 3' restante del gen con la señal de poliadenilación, junto al *enhancer* de SV40, se emplearon para asegurar la expresión del transgén. El cDNA del IGF-I está insertado en la diana *Eco*RI del tercer exón de la β -globina. En la Fig. 2A se presenta un esquema del gen quimérico.

Para realizar esta construcción (Fig. 1) se partió del plásmido pKCR3 que contenía el gen de la β -globina y el *enhancer* del SV40. El fragmento 3' de éste se aisló mediante digestión *Bam*III y *Xho*I y se introdujo en las mismas dianas del vector Bluescript SK+. Se insertó a continuación por ligación dirigida en las dianas de restricción *Sac*I/*Bam*HI de este mismo vector el fragmento de 510 pb del promotor RIP procedente del plásmido pSP65. Finalmente, el cDNA de IGF-I de ratón, obtenido a partir del plásmido pBR327 por digestión con *Eco*RI, se introdujo en esta misma diana situada en el tercer exón de la β -globina. El fragmento empleado para la microinyección conteniendo la totalidad del gen quimérico RIP/IGF-I (3,4 kb) se obtenía por restricción con los enzimas *Sac*I y *Xho*I.

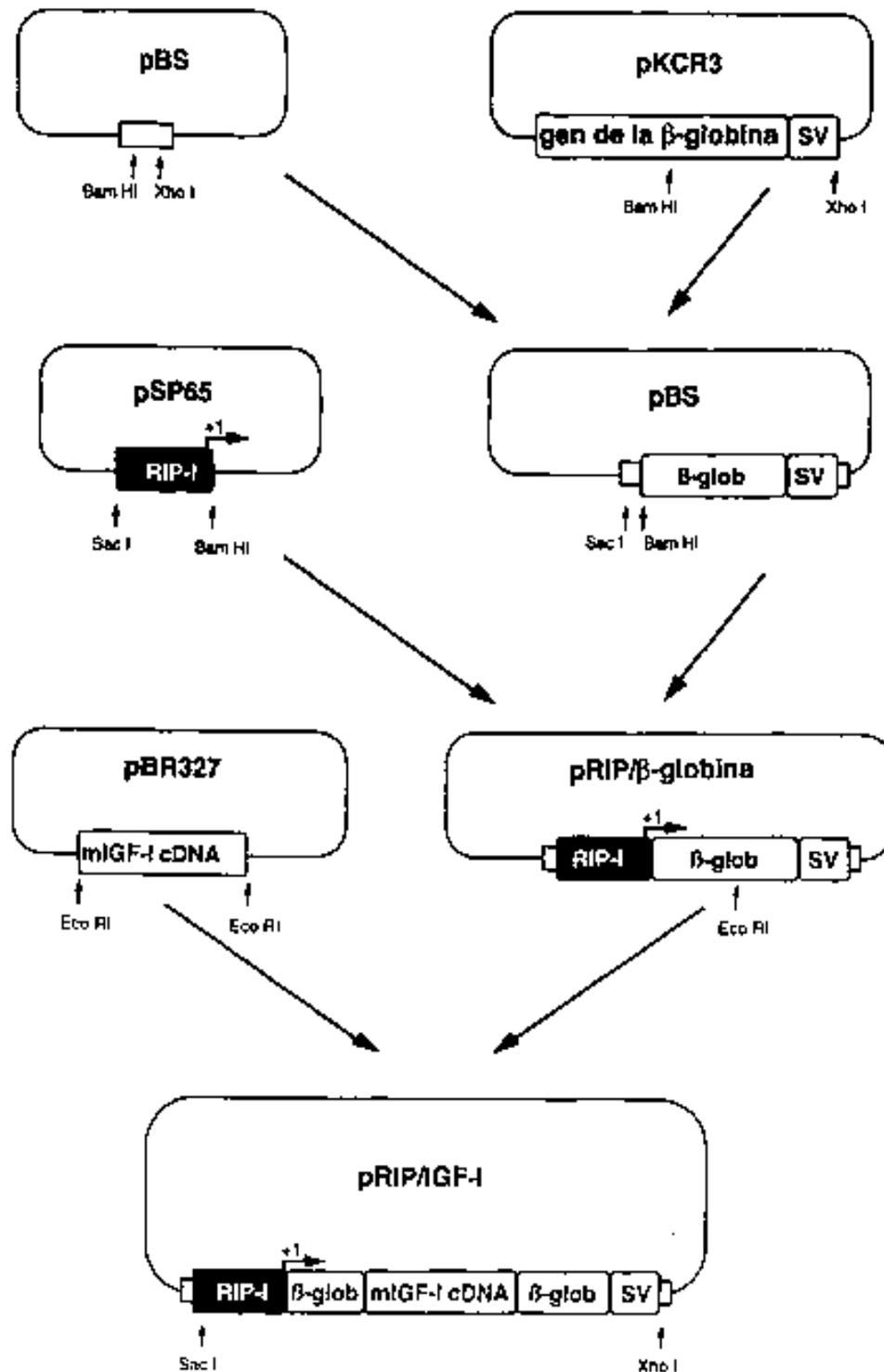


Figura 1. Construcción del gen quimérico RIP/IGF-I. El fragmento del gen de la β -globina y el enhancer del SV40 que procedía del vector pKCR3, se aisló mediante digestión enzimática de las dianas *Bam*HI y *Xho*I y se introdujo en las mismas dianas del vector Bluescript SK+. Se insertó a continuación, en las dianas de restricción *Sac*I/*Bam*HI de este mismo vector, el fragmento de 510 pb del promotor RIP, contenido en el plásmido pSP65. Finalmente, el cDNA de IGF-I de ratón, obtenido a partir del plásmido pBR327 por digestión con *Eco*RI, se introdujo en esta misma diana situada en el tercer exón de la β -globina. El fragmento empleado para la microinyección de 3,4 kb se obtenía por restricción con los enzimas *Sac*I y *Xho*I.

1.1.2. Obtención de los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I

Para la obtención de los ratones transgénicos se microinyectó el gen quimérico RIP/IGF-I a óvulos fecundados. Siguiendo las técnicas que se describen en Materiales y Métodos, se transfirieron un total de 256 cigotos microinyectados a 11 hembras receptoras, de las cuales nacieron 79 animales. Mediante análisis por Southern Blot se identificaron 6 ratones transgénicos. Tras estimar el número de copias integradas del transgén, por comparación con DNA control, se escogieron para cruzar tres animales: el macho 1 con aproximadamente 5 copias del transgén, el macho 71 con unas dos copias y la hembra 23 con alrededor de 50 copias (Fig. 2B). El ratón 1 no transmitió el carácter a la descendencia. Por el contrario, el macho 71 y la hembra 23 transmitieron el carácter al 50% de la descendencia y se estableció una colonia con cada uno de ellos.

1.1.3. Análisis de la expresión del transgén

Para comprobar la correcta expresión del gen quimérico RIP/IGF-I, se sacrificaron ratones de segunda generación (F_2) de 3 a 4 meses de edad de las líneas 23 y 71, se obtuvo el páncreas y se aisló RNA total del tejido fresco. Utilizando como sonda el cDNA del IGF-I, se analizó por Northern Blot la presencia de mensajero partiendo de 50 μ g de RNA total de páncreas de ratones transgénicos y controles. En los ratones control se detectó únicamente el transcrito mayoritario del IGF-I de 0,8 kb. Los ratones transgénicos presentaban un transcrito adicional de 1,2 kb procedente de la expresión del transgén. Este finalizaba en la señal de poliadenilación de la β -globina. En la línea 23 los niveles de transcrito de IGF-I eran unas 20 veces más altos que en los ratones control. Los ratones transgénicos de la línea 71 mostraban un incremento del mRNA de unas 3 veces respecto a los controles (datos no mostrados). El incremento del mRNA específico de IGF-I en ambas líneas demostraba claramente que los ratones transgénicos sobreexpresaban IGF-I en páncreas (Fig. 2C).

1.1.4. IGF-I en islotes de Langerhans de ratones transgénicos

El promotor del gen de la insulina de rata I dirige la expresión de genes exclusivamente a las células β del páncreas (Deltour, 1993). Para comprobar que el IGF-I producto del transgén se estaba procesando correctamente y en la localización esperada, se aislaron islotes pancreáticos, según se describe en Materiales y Métodos, de ratones transgénicos de la línea de mayor expresión (23) y de controles hermanos. A continuación, se realizó una extracción de proteína y se analizó por Western Blot empleando un anticuerpo policlonal específico de IGF-I. Los ratones transgénicos presentaron un incremento de IGF-I respecto a los controles (Fig. 2D).

1.2. PARAMETROS SERICOS DE LOS RATONES TRANSGENICOS QUE EXPRESAN EL GEN QUIMERICO RIP/IGF-I

1.2.1. IGF-I e insulina en suero

A continuación, se determinó el IGF-I presente en el suero. Para ello, se sacrificaron a primera hora de la mañana por decapitación ratones transgénicos y controles hermanos de 3 a 5 meses de edad, alimentados con dieta estándar de laboratorio. Los ratones transgénicos mostraron una reducción significativa de los niveles de IGF-I sérico de aproximadamente un 25% respecto a los ratones control (Tabla I). Esta reducción concordaba con la observada en pacientes diabéticos y en ratas tratadas con estreptozotocina (Back y Recher, 1992). Así mismo, se determinaron los niveles de IGF-I en ratones transgénicos y controles alimentados con dieta alta en carbohidratos durante 5 días y se observó que ambos grupos presentaban una clara reducción de IGF-I como efecto de la dieta (Tabla I).

También se determinaron los niveles de insulina de ratones transgénicos y controles. Los ratones transgénicos alimentados con una dieta normal de laboratorio presentaban niveles de insulina sérica del doble de los controles. La dieta alta en carbohidratos provocaba un incremento en la insulinemia en ratones control. Por el contrario, los ratones transgénicos alimentados con esta dieta presentaban una reducción de aproximadamente la mitad en los niveles de insulina sérica (Tabla I).

1.2.2. Metabolitos en suero

Se determinaron los niveles de glucosa, triglicéridos y ácidos grasos en suero con el fin de averiguar si se encontraban alterados en los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I. Los ratones transgénicos presentaban un incremento significativo de la glucemia respecto a los ratones control (Tabla I). Estas diferencias se conservaban cuando los ratones eran alimentados con una dieta alta en carbohidratos.

Los niveles de triglicéridos y ácidos grasos libres no esterificados en suero de los ratones transgénicos alimentados con dieta normal también se encontraban aumentados (Tabla I). Estos datos eran claramente indicadores de que estos animales presentaban un cuadro de resistencia a la insulina, característico de la diabetes tipo II. En cuanto a los niveles de colesterol, no se observaban diferencias significativas (Tabla I).

Tabla I. Parámetros séricos de los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I

	Dieta estándar		Dieta alta en carbohidratos	
	Con	Tg	Con	Tg
Glucosa (mg/dl)	148±7	205±10*	156±15	248±21*
Insulina (ng/ml)	1,4±0,1	3,1±0,2**	2,9±0,4	1,5±0,2**
IGF-I (ng/ml)	231±15	170±15*	135±12	97±15*
Triglicéridos (mg/dl)	129±8	218±13**	N.D.	N.D.
NEFAs (mmol/l)	0,9±0,05	1,6±0,05*	N.D.	N.D.
Colesterol (mg/dl)	77±5	88±5	N.D.	N.D.

Se determinaron los parámetros séricos de 15 animales control (Con) y 15 transgénicos (Tg) alimentados con dieta normal y dieta alta en carbohidratos. Las hormonas se determinaron por radioinmunoensayo. La glucemia se determinó por el sistema Reflotrón® y el resto de metabolitos mediante ensayos enzimáticos adaptados al autoanalizador COBAS BIO. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$. N.D., No determinado.

1.2.3. Curva de tolerancia a la glucosa

Para comprobar si los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I habían desarrollado un proceso de resistencia a la insulina, animales alimentados transgénicos y controles fueron anestesiados y sometidos a un test de tolerancia a la glucosa. Este se realizó mediante una inyección intraperitoneal del azúcar (1 mg/g peso vivo) a tiempo 0 y se llevó a cabo un seguimiento de la glucemia durante 180 minutos. Los ratones transgénicos no sólo mostraron niveles basales de glucemia superiores, sino una clara alteración de la curva de tolerancia a la glucosa. Dado que los machos y las hembras transgénicos no presentaban el mismo patrón de respuesta, se agruparon por sexos. Los machos transgénicos alcanzaron niveles marcadamente superiores a los de sus hermanos control, en ocasiones

superando el límite superior de detección del sistema (>600mg/dl), y mantuvieron estos niveles elevados a lo largo de las tres horas que duró el estudio (Fig. 4A). Tras la inyección intraperitoneal del azúcar, las hembras transgénicas mostraron un incremento de la glucemia mayor que sus hermanas control, y por tanto, eran más intolerantes al azúcar. Sin embargo, no mostraron una curva de tolerancia a la glucosa tan alterada como la de los machos de la misma línea (4B).

Se realizó este mismo experimento en machos transgénicos de la línea 71. Estos últimos presentaron un patrón de tolerancia a la glucosa similar al de los machos de la línea 23, aunque con valores ligeramente inferiores (Fig. 4C). Estos resultados indicaban que la expresión de IGF-I había provocado un cuadro de diabetes y descartaba que el lugar de integración del transgén fuera responsable de los efectos observados.

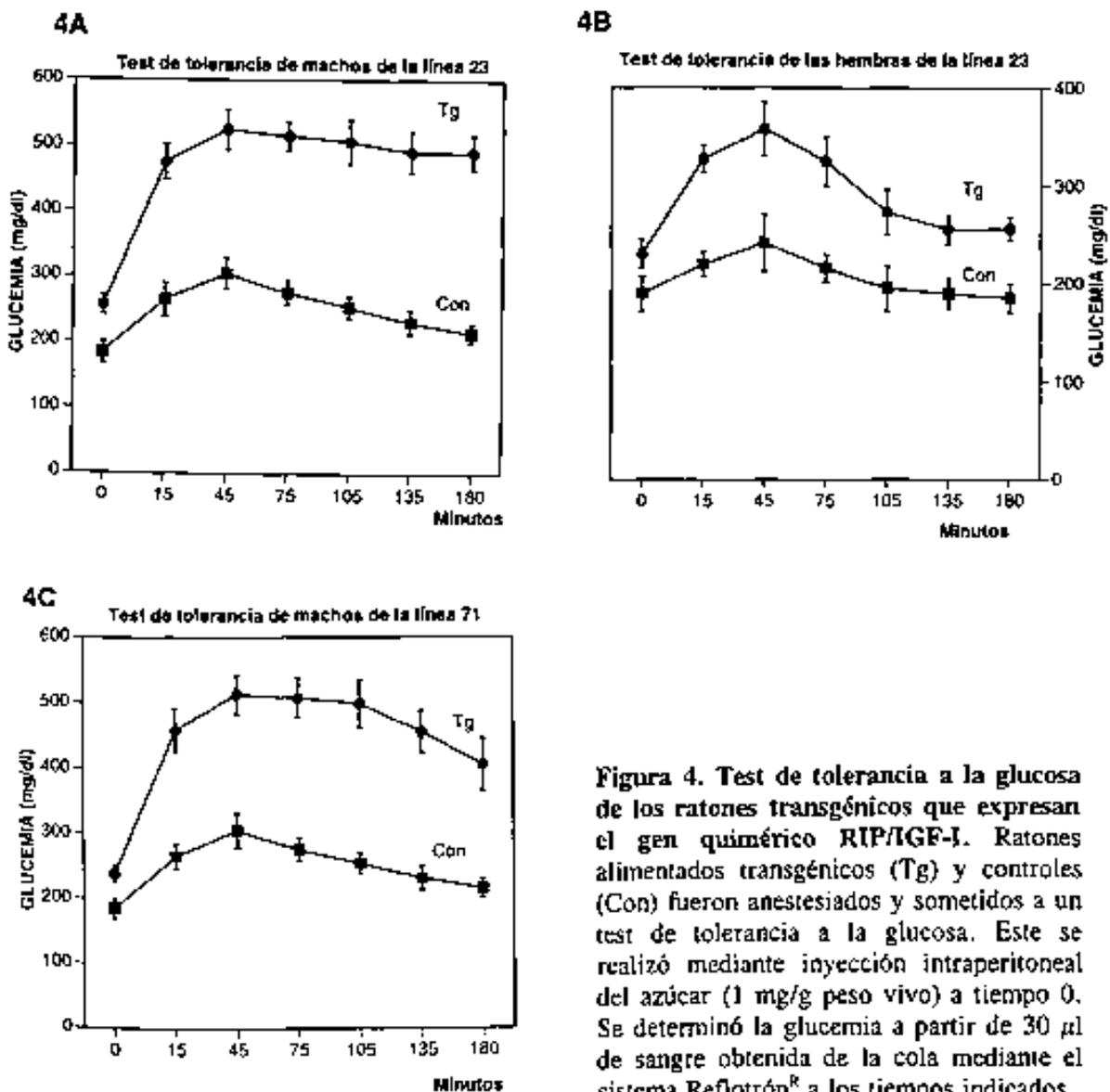


Figura 4. Test de tolerancia a la glucosa de los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I. Ratones alimentados transgénicos (Tg) y controles (Con) fueron anestesiados y sometidos a un test de tolerancia a la glucosa. Este se realizó mediante inyección intraperitoneal del azúcar (1 mg/g peso vivo) a tiempo 0. Se determinó la glucemia a partir de 30 μ l de sangre obtenida de la cola mediante el sistema Reflotrón[®] a los tiempos indicados.

Test de tolerancia de 10 ratones machos controles y 10 transgénicos machos de la línea 23 (A), de 8 ratones controles y 8 transgénicos hembras de la línea 23 (B) y de 8 ratones controles y 8 transgénicos machos de la línea 71. Las diferencias son significativas a lo largo del test de tolerancia.

1.3. PESOS Y MORFOMETRIA DEL PANCREAS DE LOS RATONES TRANSGENICOS QUE EXPRESAN EL GEN QUIMERICO RIP/IGF-I

1.3.1. Peso corporal y de los órganos

Se ha descrito que los animales transgénicos que sobreexpresan IGF-I en hígado presentan alteraciones de peso en distintos órganos diana de este factor. Con el fin de averiguar si los ratones que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I presentaban variaciones en el peso corporal y de distintos órganos (páncreas, bazo, riñón derecho, hígado y cerebro), se pesaron animales control y transgénicos de tres meses de edad. Los animales transgénicos no presentaron diferencias significativas, respecto a los animales control, en el peso corporal o en los pesos de hígado, riñón derecho y cerebro (Tabla II). Por el contrario, el peso de páncreas y bazo de los animales transgénicos estaba incrementado respecto al de los controles.

Tabla II. Peso vivo y de los órganos de los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I

	Controles	Tg
PV(g)	23,8±0,8	24,2±0,4
páncreas (% de P.V.)	0,56±0,02	0,63±0,02*
bazo (% de P.V.)	0,33±0,02	0,50±0,05*
riñón (% de P.V.)	0,74±0,02	0,75±0,02
hígado (% de P.V.)	5,8±0,3	5,8±0,2
cerebro (% de P.V.)	1,87±0,06	1,86±0,06

Se pesaron 10 animales control y 10 transgénicos (Tg) alimentados con dieta normal. Posteriormente se sacrificaron y se pesaron los órganos de interés. Los resultados se expresan como porcentaje de peso del órgano respecto al peso corporal. * $p < 0,05$.

1.3.2. Morfometría del páncreas

Al comprobar que el páncreas de los animales transgénicos que expresaban el gen quimérico RIP/IGF-I presentaba un peso incrementado, se decidió estudiar el % de área de célula β respecto al área total de páncreas. Este incremento de peso del páncreas podía estar o no asociado a un aumento proporcional de masa de célula β . Además, este parámetro está

modificado en varios modelos animales de diabetes tipo II, considerándose una de las causas de la alteración de la capacidad secretora de insulina frente a una carga de glucosa.

Con el fin de determinar el área de célula β , se realizó un análisis morfométrico del páncreas de ratones transgénicos y controles. Se llevó a cabo tras delimitar el área mediante inmunohistoquímica con anticuerpo anti-insulina en secciones de tejido pancreático (Fig. 5) según se describe en Materiales y Métodos (2.10.2.). En la Tabla III se recogen estos resultados. Los ratones transgénicos presentaron un incremento significativo del área de célula β . Además, al calcular el % de célula β del páncreas respecto al peso corporal de cada animal se obtuvo un índice de la masa de célula β total. De este modo, se pudo observar que los ratones transgénicos que expresaban el gen quimérico RIP/IGF-I presentaban prácticamente el doble de masa de célula β , y en consecuencia, el doble de capacidad productora de insulina. Esta característica podría explicar, al menos en parte, la hiperinsulinemia de los ratones transgénicos.

5.1.4. SECRECIÓN DE INSULINA EN ISLOTES PANCREÁTICOS AISLADOS DE RATONES QUE EXPRESAN EL GEN QUIMÉRICO RIP/IGF-I

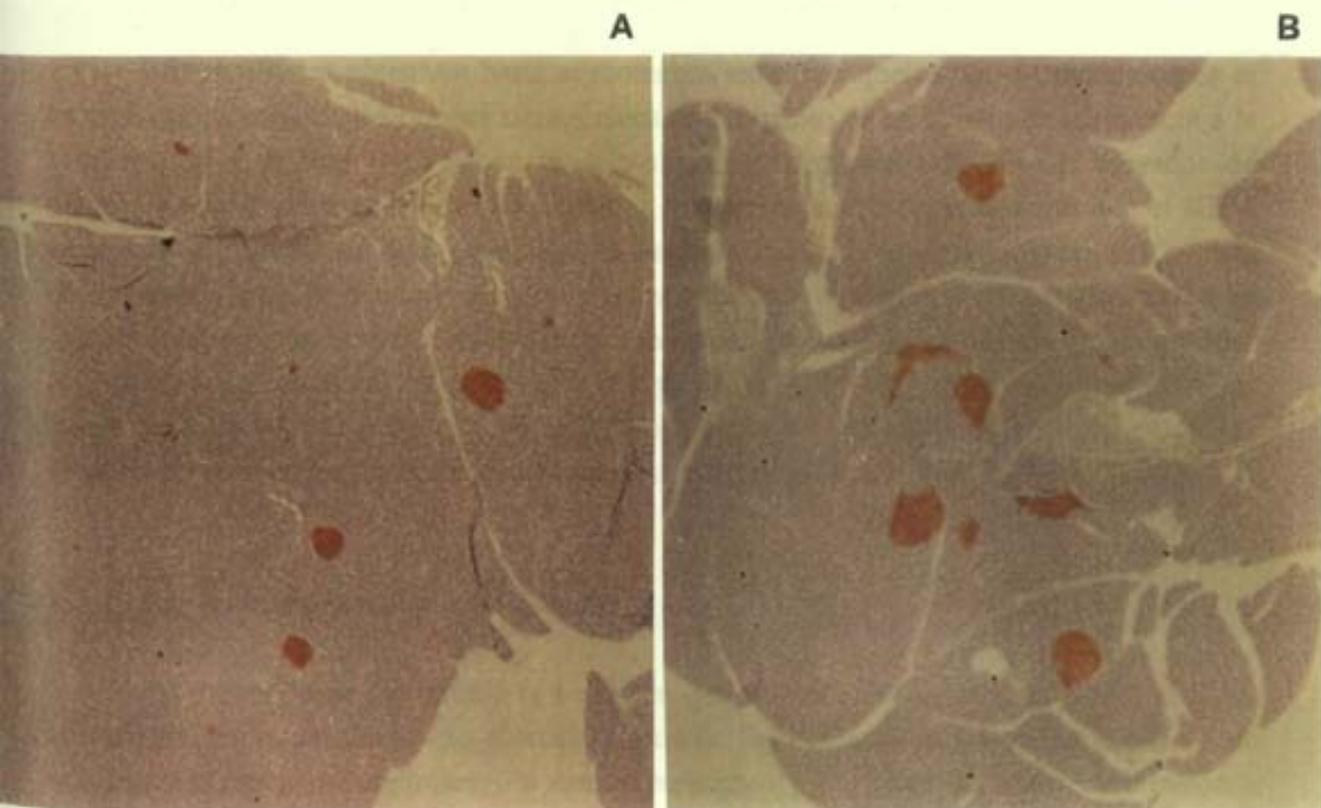


Figura 5. Inmunohistoquímica de secciones de páncreas con anticuerpo anti-insulina de los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I. A) Islotes pancreáticos de ratón control de 3 meses de edad. B) Islotes pancreáticos de ratón transgénico de 3 meses de edad.

Tabla III. Análisis morfométrico del páncreas de los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I

	% de célula β en páncreas	Nº de islotes/mm ³	% de célula β de P.V.(10 ⁻³)
CONTROLES	0,42±0,05	1,4±0,2	2,2±0,2
TRANSGENICOS	0,60±0,07*	2,1±0,25*	4±0,4**

Se analizaron 3 secciones de páncreas de 5 ratones control y 5 transgénicos. El área de célula β se delimitó mediante inmunohistoquímica con anticuerpo anti-insulina porcina. El análisis de imagen se realizó según se describe en Materiales y Métodos (2.10.2.). P.V., Peso Vivo. * p<0,05, ** p<0,005.

1.4. SECRECIÓN DE INSULINA EN ISLOTES PANCREATICOS AISLADOS DE RATONES QUE EXPRESAN EL GEN QUIMERICO RIP/IGF-I

Los resultados obtenidos hasta el momento indicaban que el IGF-I producido por el transgén provocaba en los ratones transgénicos el desarrollo de un cuadro de resistencia a la insulina. Estos ratones presentaban hiperinsulinemia acompañada de niveles elevados de glucosa y triglicéridos en suero. Sin embargo, anteriormente se había descrito que el IGF-I tiene un efecto inhibitor de la secreción de insulina (Leahy y Vanderkerkhove, 1990). Este efecto estaría más de acuerdo con los niveles reducidos de insulina sérica observados en ratones transgénicos alimentados con dieta alta en carbohidratos. Así pues, a fin de estudiar los mecanismos mediante los cuales el IGF-I producía el fenotipo observado y conocer las bases moleculares de su acción, se analizó el patrón de secreción de insulina en islotes aislados de ratones transgénicos que expresaban el gen quimérico RIP/IGF-I.

1.4.1. Secreción de insulina a 90 minutos

En primer lugar, se estudió la secreción de insulina a 90 minutos en islotes aislados a concentraciones crecientes de glucosa. Con este fin, se aislaron islotes pancreáticos de ratones transgénicos y controles. En este experimento y en todos los que se realizaron a continuación, se emplearon ratones machos entre 3 y 6 meses de edad. Los islotes aislados fueron incubados durante 90 minutos a concentraciones crecientes de glucosa: 0; 2,8; 5,5; 11,1 y 16,7 mM. Los ratones transgénicos presentaron un patrón de secreción de insulina con claras diferencias respecto a los controles. A bajas concentraciones, glucosa 0; 2,8 y 5,5 mM, los ratones transgénicos secretaban significativamente más insulina. Por el contrario, a concentraciones superiores, en que la glucosa estimulaba marcadamente la secreción en los controles, los ratones transgénicos presentaban una disminución de la respuesta

insulinosecretora a la glucosa (Fig. 6).

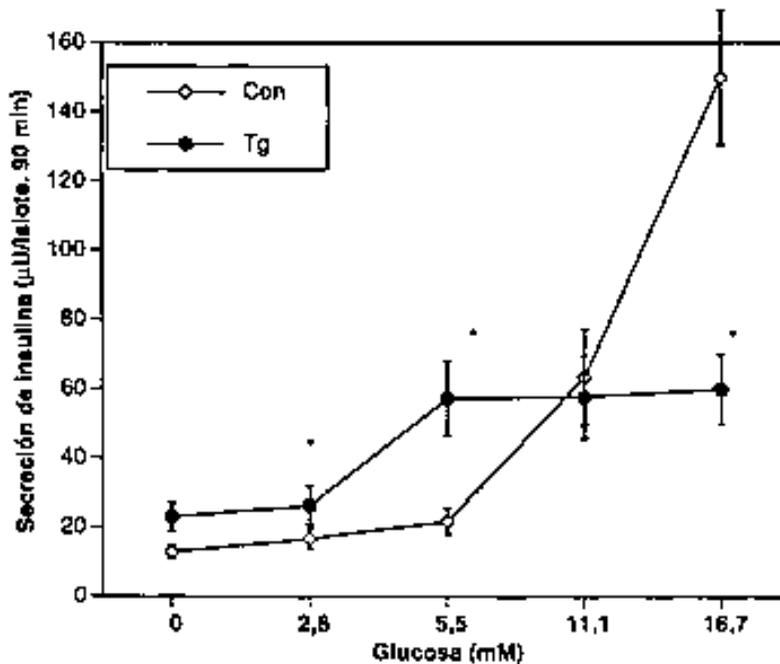


Figura 6. Efecto de la concentración de glucosa sobre la secreción de insulina por islotes aislados de los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I. Islotes pancreáticos aislados de 10 ratones control (Con) y 10 transgénicos (Tg) se incubaron, en grupos de 6, a 37°C durante 90 minutos. Las incubaciones se realizaron a concentraciones crecientes de glucosa: 0 mM; 2,8 mM; 5,5 mM; 11,1 mM y 16,7 mM. A continuación, se recuperó el medio de incubación para la determinación de insulina por RIA. * $p < 0,005$.

1.4.2. Perifusión de islotes aislados

Ante estos resultados se consideró adecuado realizar un experimento de perifusión de islotes aislados. Esta técnica permite conocer el patrón de secreción de insulina de los islotes minuto a minuto cuando son sometidos a una estimulación con glucosa. De este modo, se obtendría información de las dos fases de la respuesta secretora. Con este fin, se aislaron islotes de ratones controles y transgénicos y se procedió a su perifusión. Se colocaron 75 islotes por cámara de incubación y se sometieron durante los primeros 45 minutos a un flujo continuo de solución glucosa 5,5 mM para estabilizar el sistema. A partir del minuto 45, hasta el 75, se realizó la perifusión con la solución de alta concentración de glucosa (16,7 mM), y durante los 15 minutos restantes los islotes se mantuvieron de nuevo en una solución

de 5,5 mM. Las curvas de respuesta secretora representativas de los dos experimentos para controles y transgénicos se muestran en la Fig. 7. Los ratones transgénicos presentaron durante la infusión de glucosa 5,5 mM una secreción basal de insulina superior a los controles. Sin embargo, cuando fueron sometidos a la estimulación por glucosa 16,7 mM, los ratones control mostraron una marcada respuesta a la glucosa, mientras los ratones transgénicos presentaron una respuesta disminuida. Esta deficiencia se produjo tanto en la fase aguda, al inicio de la respuesta secretora, como en la meseta de la segunda fase.

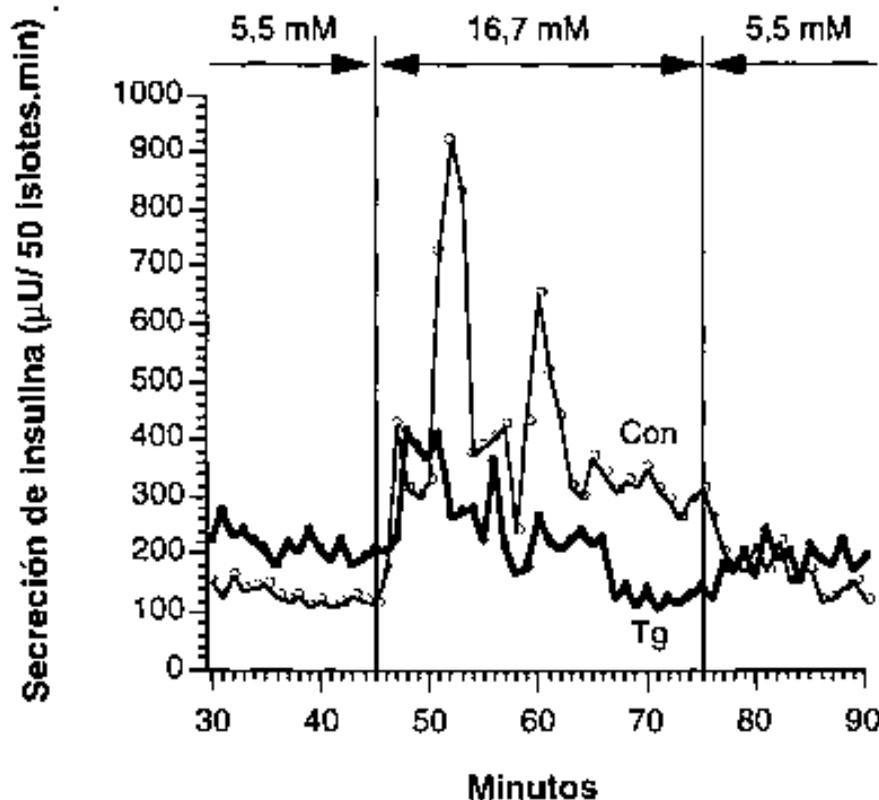


Figura 7. Perfusión de islotes aislados en presencia de glucosa. Islotes aislados de 8 ratones control (Con) y 8 ratones transgénicos (Tg) se colocaron en grupos de 75 por cámara de incubación y se sometieron durante 45 minutos a un flujo continuo de solución glucosa 5,5 mM. En el periodo de tiempo comprendido entre el minuto 45 y 75 se realizó la perfusión con la solución de glucosa de 16,7 mM y durante los 15 minutos restantes los islotes se mantuvieron de nuevo en una solución de 5,5 mM. Minuto a minuto se recogieron los medios de perfusión para la determinación de la insulina secretada por RIA.

1.4.3. Estimulación de la secreción de insulina por otros secretagogos

Para conocer en mayor detalle la respuesta secretora de los ratones transgénicos, se estudió la secreción de insulina en respuesta a otros secretagogos eficaces, concretamente las combinaciones de glucosa (2,8 mM) + leucina/glutamina y glucosa (2,8 mM) + arginina.

Estos experimentos los consideramos una buena aproximación para conocer si el efecto inhibitor de la secreción de insulina producido por el IGF-I afectaba un mecanismo común a todos los secretagogos, o por el contrario, sólo actuaba sobre la vía de señal de la glucosa.

Con este fin se aislaron islotes de ratones transgénicos y controles y se incubaron 90 minutos a 37°C bajo tres condiciones diferentes: glucosa 2,8 mM, glucosa 2,8 mM + leucina 10 mM + glutamina 10 mM y glucosa 2,8 mM + arginina 10 mM. Los islotes de los ratones transgénicos tratados con los aminoácidos leucina/glutamina mostraron una disminución significativa de la secreción de insulina en comparación con los controles. Esta diferencia no se apreciaba en los islotes estimulados con arginina (Tabla IV).

Tabla IV. Efecto de los aminoácidos sobre la secreción de insulina en los ratones que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I

	Control	Tg
Glucosa 2,8 mM	33 ± 6	52 ± 5*
Glucosa 2,8 mM + Leu/Glu 10 mM	122 ± 23	56 ± 11*
Glucosa 2,8 mM + Arginina 10 mM	73 ± 16	61 ± 12

Islotes aislados de 4 ratones controles y transgénicos (Tg) se incubaron 90 minutos a 37°C en tres condiciones de glucosa 2,8 mM; glucosa 2,8 mM+leucina 10 mM/glutamina 10 mM y glucosa 2,8 mM+arginina 10 mM. El medio de incubación se recuperó posteriormente para la determinación de insulina por RIA. Los resultados se expresan en μ U de insulina /islote-90 min. Los resultados se expresan en μ U de insulina/islote-90 min. * $p < 0,05$.

1.4.4. Estimulación de la secreción de insulina por forskolina

El incremento de cAMP intracelular estimula la secreción de insulina. El agente forskolina es un potente estimulador de la respuesta insulinosecretora a la glucosa, ya que activa la adenilato ciclasa.

Para investigar si el IGF-I modificaba los niveles intracelulares de cAMP y así alteraba la secreción de insulina, se aislaron islotes pancreáticos de ratones control y transgénicos y se incubaron con glucosa a concentraciones de 5,5 y 16,7 mM y con glucosa 16,7 mM + forskolina 5 μ M. Los islotes de ratones controles y transgénicos mostraron en las condiciones de glucosa 5,5 y 16,7 mM el patrón observado en experimentos anteriores. Cuando los islotes fueron sometidos a glucosa 16,7 mM + forskolina 5 μ M, los controles

alcanzaron los niveles más altos de secreción de insulina, mientras los islotes de los transgénicos presentaron una disminución de la secreción de insulina similar a la observada a 16,7 mM. De este modo, la respuesta secretora de los islotes aislados de ratones transgénicos era aproximadamente tres veces menor a la de los controles (Fig. 8).

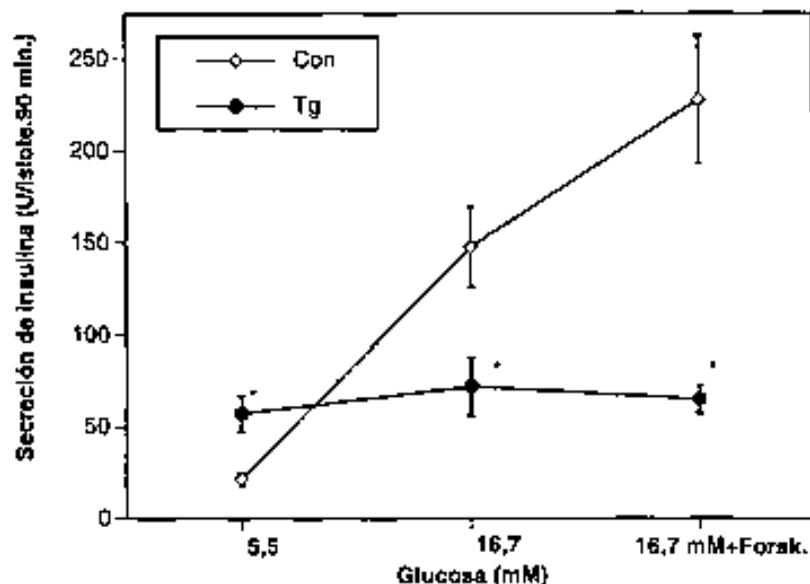


Figura 8. Estimulación de la secreción de insulina por forskolina en islotes de ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I. Islotes pancreáticos aislados de 10 ratones control (Con) y 10 transgénicos (Tg) fueron incubados con glucosa a concentraciones de 5,5 y 16,7 mM y con glucosa 16,7 mM + forskolina 5 μ M. Se determinó la cantidad de insulina secretada por islote a los 90 min. * $p < 0,005$.

1.4.5. Contenido de insulina de los islotes pancreáticos

Tras realizar los anteriores experimentos de medida de secreción de insulina, se tomaron muestras al azar de cada condición para determinar el contenido de insulina por islote. Los islotes de controles y transgénicos no presentaban diferencias de contenido de insulina en las condiciones de incubación de glucosa 5,5 mM y 16,7 mM. Sin embargo, cuando eran incubados en alta concentración de glucosa en presencia de forskolina, los islotes

de los ratones transgénicos presentaban un menor contenido de insulina (Tabla V).

Tabla V. Contenido de insulina de islotes aislados de ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-1

	Con	Tg
Glucosa 5,5 mM	525 ± 57	528 ± 43
Glucosa 16,7 mM	1532 ± 281	1548 ± 152
Glucosa 16,7 mM + Forskolina 5 μM	2142 ± 323	1265 ± 218*

Islotes aislados de ratones controles (Con) y transgénicos (Tg) se incubaron a 37°C durante 90 minutos en las condiciones de glucosa 5,5 mM; 16,7 mM y 16,7 mM + Forskolina 5 μM. El contenido de insulina de los islotes se determinó posteriormente mediante la obtención de un extracto en solución ácido-alcohólica y la medida de insulina por RIA. Los resultados se expresan en μU de insulina /islote.

* p < 0,01.

1.4.6. Contenido de cAMP de los islotes incubados a altas concentraciones de glucosa

Al observar una marcada inhibición de la secreción de insulina en islotes aislados de los ratones transgénicos tratados con forskolina, así como una disminución del contenido de la hormona, se determinó a continuación la concentración de cAMP de éstos a altas concentraciones de glucosa (20 mM). Se aislaron islotes a partir de ratones controles y transgénicos y en grupos de 30 se incubaron en una solución de glucosa 20 mM a 37 °C durante 25 minutos. A continuación, se congelaron en solución final 6% TCA y se procesaron para la determinación del contenido de cAMP. En la tabla VI se puede observar que los niveles del segundo mensajero en los islotes de los ratones transgénicos eran prácticamente un tercio de los de los controles (Tabla VI).

A fin de determinar si la reducción en los niveles de cAMP se debía a una inhibición de la adenilato ciclasa, activada potentemente por la forskolina, a una activación de las fosfodiesterasas, inhibidas por isobutilmetilxantina (IBMX), o a ambos procesos simultáneamente, se realizó un segundo experimento. Se aislaron islotes de ratones transgénicos y controles y en grupos de 30 se incubaron 15 minutos en solución de glucosa 20 mM. A continuación, se incubaron otros 10 minutos en presencia de forskolina 5 μM,

IBMX 10 mM o forskolina 5 μ M + IBMX 10 mM, y se determinó el contenido del nucleótido. En la Tabla VI se muestra el resultado de dicho experimento en el que se observa una disminución del contenido de cAMP en todas las condiciones de incubación, tanto en la estimulación por forskolina, como por IBMX (Tabla VI).

Tabla VI. Contenido de cAMP de islotes aislados de ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I

	Con	Tg
Glucosa 20 mM	205 \pm 26	78 \pm 10*
Glucosa 20 mM + IBMX 10 mM	1210 \pm 130	780 \pm 75*
Glucosa 20 mM + Forskolina 5 μ M	8561 \pm 740	4860 \pm 520*
Glucosa 20 mM + IBMX 10 mM + Forskolina 5 μ M	20125 \pm 1540	10750 \pm 1270*

Grupos de 30 islotes, aislados de ratones controles (Con) y transgénicos (Tg), se incubaron a 37°C durante 15 minutos en solución de glucosa 20 mM, más 10 minutos en ausencia o presencia de un agente estimulador: IBMX 10 mM, Forskolina 5 μ M o IBMX 10 mM + Forskolina 5 μ M. A continuación, fueron congelados en solución final 6% TCA y procesados para la medida de cAMP por radioinmunoensayo. Los resultados se expresan en fmoles de cAMP/ μ g de DNA. * $p < 0,001$.

1.5. ESTUDIO DEL METABOLISMO HEPÁTICO DE CARBOHIDRATOS EN LOS RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN EL GEN QUIMÉRICO RIP/IGF-I

Los estudios realizados hasta el momento indicaban que los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I desarrollan un proceso diabético. Los resultados obtenidos del estudio de la funcionalidad de la célula β eran claramente indicadores de que estos animales presentaban una respuesta insulinosecretora deficiente en las situaciones de mayor requerimiento de insulina (altas concentraciones de glucosa). Estas alteraciones podrían repercutir en otros tejidos. El hígado es uno de los principales tejidos diana de la insulina y es fundamental en el control de la homeostasia de carbohidratos. Los hepatocitos ayudan al mantenimiento de la glucemia mediante activación de la glucogenólisis y la gluconeogénesis en el ayuno. A continuación, estudiamos si los ratones transgénicos presentaban anomalías metabólicas en hígado.

1.5.1. Expresión del gen del IGF-I hepático

El hígado es el principal órgano productor de IGF-I circulante (Salmon y Daughaday, 1957). Hemos observado que los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I presentan una disminución del IGF-I sérico. Para comprobar que esta reducción se correlacionaba con una reducción de la producción del factor en hígado, se estudió la expresión de IGF-I mediante análisis por Northern Blot a partir de muestras de tejido hepático de ratones transgénicos y controles alimentados con dieta normal. Los ratones transgénicos presentaron una disminución de la expresión de IGF-I, respecto a los ratones control. Estos resultados concordaban con los valores séricos del factor (Fig. 9).

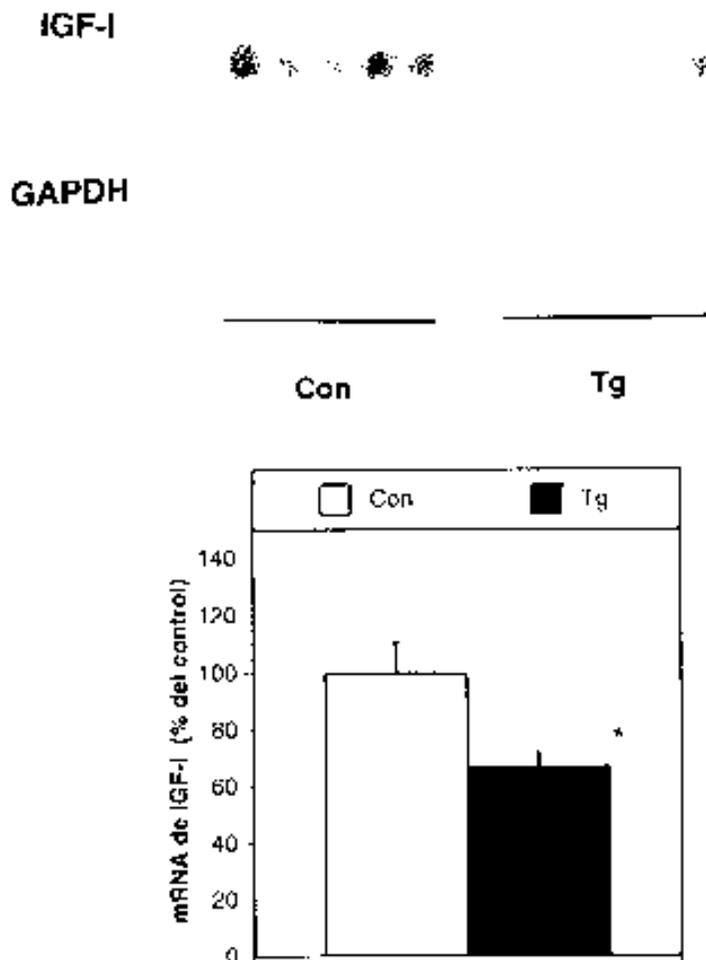


Figura 9. Expresión del gen del IGF-I hepático de ratones transgénicos RIP/IGF-I. 15 ratones transgénicos (Tg) y 15 controles (Con) fueron sacrificados. Se aisló el hígado y fue seguidamente congelado en nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se procesaron para la obtención de RNA total según se indica en Materiales y Métodos. Tras el análisis por Northern Blot se hibridó con sonda específica para IGF-I. Los resultados se normalizaron con GAPDH y se expresan como porcentaje de expresión del gen en ratones control. * $p < 0,005$.

1.5.2. Expresión en hígado de los genes de GLUT-2, glucoquinasa y piruvato quinasa

El transporte facilitado de glucosa plasmática a través de las membranas de las células es el paso inicial en el metabolismo de la glucosa. El GLUT-2 es el único transportador de glucosa de alta K_m que se encuentra solamente en células que participan en la regulación de la homeostasis de la glucosa sanguínea, como los hepatocitos y las células β del páncreas. En el hígado juega un papel doble en el transporte de glucosa, ya que permite la entrada de glucosa cuando la gluconeogénesis y la glucogenólisis están inhibidas y libera glucosa cuando la gluconeogénesis y la glucogenólisis están activadas (Johnson y col., 1990). La regulación del GLUT-2 se produce principalmente a nivel transcripcional. La hiperglucemia es un potente estimulador, si bien, se ha descrito que la hiperinsulinemia inhibe su transcripción (Burcelin y col., 1992).

Los hepatocitos son capaces de responder a fluctuaciones en los niveles de glucosa por cambios paralelos en su velocidad de fosforilación a glucosa 6-fosfato. El enzima clave en la regulación de este proceso es la glucoquinasa. Su especificidad para la glucosa, su alta K_m y la no existencia de inhibición por producto, aseguran un gradiente de entrada de glucosa al hepatocito. La actividad glucoquinasa se correlaciona con cambios en mRNA y con la velocidad de transcripción de su gen (Spence, 1983; Sibirrowski y Seitz, 1984; Iynedjian y col., 1987; Iynedjian y col., 1988; Granner y Pilkis, 1990). En animales diabéticos, en los que la glucólisis está bloqueada y la gluconeogénesis está incrementada, los niveles de mRNA de la glucoquinasa son muy bajos (Iynedjian y col., 1987; Iynedjian y col., 1988; Nishi y col., 1988; Andreone y col., 1989; Magnuson y col., 1989; Iynedjian y col., 1989; Granner y Pilkis, 1990).

La piruvato quinasa, juega un papel central en la regulación de la vía glucolítica (Pilkis y col., 1988). La modulación rápida del flujo metabólico es debida al control de la actividad enzimática por efectores alostéricos y por el estado de fosforilación. La modulación a largo plazo es debida al control de la cantidad de enzima, lo cual se lleva a cabo mediante cambios en la expresión de su gen. Sin embargo, la regulación crónica del mRNA de la forma hepática de la piruvato quinasa (L) por hormonas y por la dieta es compleja. La disminución de la actividad piruvato quinasa y de los niveles de mRNA en hígado por acción del ayuno y de la diabetes, revierte tras realimentación con una dieta alta en carbohidratos y por administración de insulina (Miyonaga y col., 1982; Pool y col., 1982). La acción conjunta de glucosa e insulina en hepatocitos de rata en cultivo primario estimula la expresión del gen de la piruvato quinasa L e incrementa la estabilidad del mRNA. Ni la glucosa, ni la insulina actúan separadamente (Decaux y col., 1989).

Los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I mostraron una disminución significativa de la cantidad de mRNA de los genes del transportador de glucosa GLUT-2 y la glucoquinasa en hígado, respecto a los ratones control. Por el contrario, no se

apreciaron diferencias significativas al comparar la cantidad de mensajero del gen de la piruvato quinasa (Fig. 10).

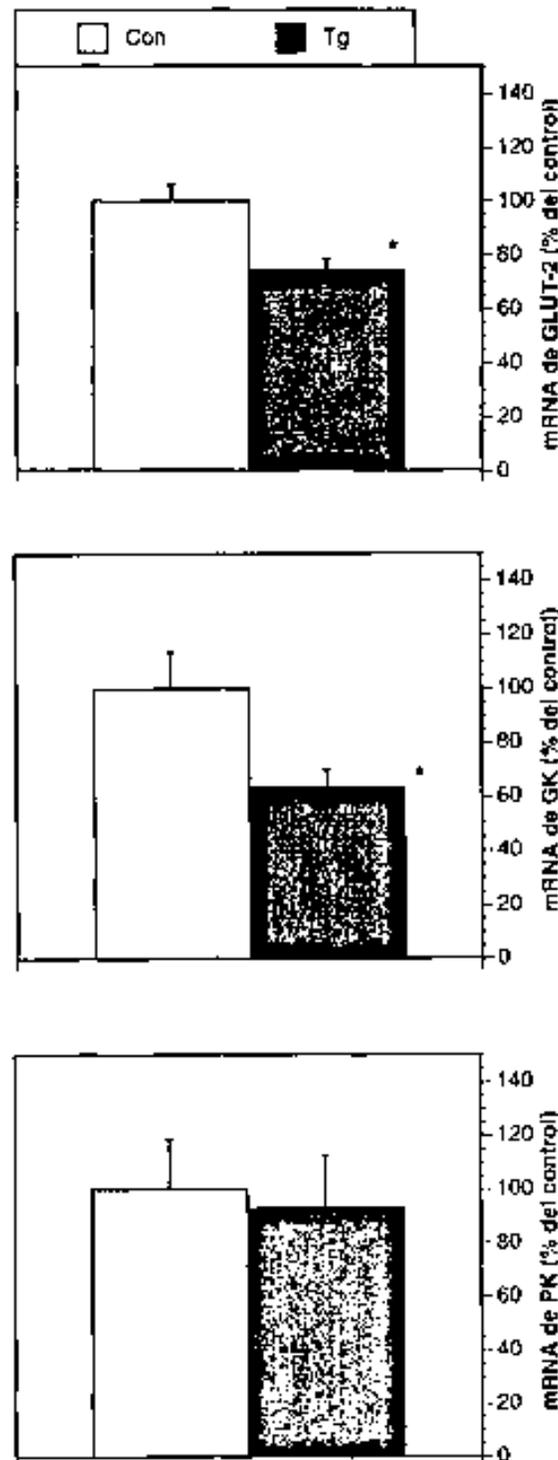


Figura 10. Expresión de los genes del GLUT-2, glucoquinasa y piruvato quinasa en hígado de ratones transgénicos RIP/IGF-I. 15 ratones transgénicos (Tg) y 15 controles (Con) fueron sacrificados. Se aisló el hígado y fue seguidamente congelado en nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se procesaron para la obtención de RNA total según se describe en Materiales y Métodos. Tras el análisis por Northern Blot se hibridó con sonda específica para cada uno de los genes. Los resultados se normalizaron con GAPDH y se expresan como porcentaje de expresión del gen en ratones control. * $p < 0,005$.

1.5.3. Actividad hepática glucoquinasa y piruvato quinasa

Para la determinación de las actividades enzimáticas glucoquinasa y piruvato quinasa se sacrificaron ratones transgénicos y controles alimentados con dieta estándar de laboratorio. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla VII. La actividad glucoquinasa de los ratones transgénicos alimentados con dieta normal estaba disminuida un 40% en relación a la de los controles. En la determinación de la actividad enzimática hexoquinasa I no se observaron diferencias significativas entre controles y transgénicos (datos no mostrados).

La actividad piruvato quinasa activa, medida a baja concentración de fosfoenolpiruvato (PEP), se hallaba disminuida alrededor de un 25% en los ratones transgénicos. La actividad enzimática total, determinada a alta concentración de PEP se encontraba más reducida, aproximadamente un 35% respecto a la de los controles (Tabla VII).

Tabla VII. Actividades glucoquinasa y piruvato quinasa hepáticas

	GK (U/mg prot.)	PK (mol/mg prot.)	
		PEP 0,15 mM	PEP 5mM
CONTROL	17,1 ± 1,4	26 ± 1,1	486,2 ± 35,3
TRANSGENICO	9,9 ± 1,3*	19,5 ± 1,9#	324,8 ± 27**

Resultados de 12 ratones de cada condición. Las actividades se determinaron a partir de extractos de hígado según se describe en Materiales y Métodos (2.12.). * p < 0,001, ** p < 0,005, #p < 0,01.

1.5.4. Contenido hepático de glucógeno y glucosa 6-P

El destino de la glucosa, una vez fosforilada, varía en función de las necesidades energéticas del animal. Esto obliga a almacenarla, en momentos de abundancia, en forma de glucógeno para ser utilizada cuando sea necesario. En el hígado las partículas de este polisacárido se agregan en gránulos de hasta varios miles de millones de daltons. Estos contienen los enzimas reguladores de las vías de síntesis y degradación del glucógeno: glucógeno sintasa y glucógeno fosforilasa. La regulación de estas enzimas es compleja y se produce a nivel transcripcional y posttraduccional.

El contenido de glucosa 6-P y glucógeno en hígado se determinó a partir de muestras obtenidas de ratones controles y transgénicos. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla VIII. Los niveles de glucosa 6-P en hígado de ratones transgénicos eran significativamente menores que los de los controles. Además, se apreciaba una disminución significativa de la

glucosa libre hepática en ratones transgénicos. El contenido de glucógeno hepático de los ratones transgénicos alimentados con dieta normal se encontraba reducido en un 20% respecto al de los controles.

Tabla VIII. Contenido de glucosa 6-P, glucosa libre y glucógeno en los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I

	Glucosa 6-P ($\mu\text{mol/g}$ hígado)	Glucosa libre (mg/g hígado)	Glucógeno (mg/g hígado)
CONTROL	1,09 \pm 0,08	4,56 \pm 0,18	42,9 \pm 2,1
TRANSGENICO	0,73 \pm 0,04*	3,85 \pm 1,8*	34,9 \pm 1,9*

Resultados de 15 ratones de cada condición. Las determinaciones se realizaron a partir de extractos de hígado según se describe en Materiales y Métodos (2.12.). * $p < 0,01$.

La tinción de cortes histológicos de hígado de ratones controles y transgénicos mediante la reacción de ácido periódico de Schiff (PAS) permitió observar una disminución del contenido hepático de glucógeno (Fig. 11).

1.5.5. Expresión en hígado de los genes de la P-enolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la tirosina aminotransferasa (TAT)

La P-enolpiruvato carboxiquinasa es un enzima clave de la gluconeogénesis y está finamente regulado por hormonas. La actividad enzimática de la PEPCK aumenta tras el ayuno prolongado y disminuye cuando el animal es realimentado (Shrago y col., 1967). La regulación de la PEPCK se produce a nivel de transcripción del gen. El glucagón a través del cAMP y los glucocorticoides estimulan la transcripción, mientras la insulina la inhibe (Short y col., 1986). Por otro lado, la tirosina aminotransferasa también es un enzima involucrado en el proceso gluconeogénico, cuya regulación tiene lugar a nivel de la expresión del gen de forma similar a la PEPCK (Vaultont y Kahn, 1994).

Al estudiar la expresión de estos dos genes en hígado de ratones transgénicos y controles, no se apreciaron diferencias significativas (Fig. 12).

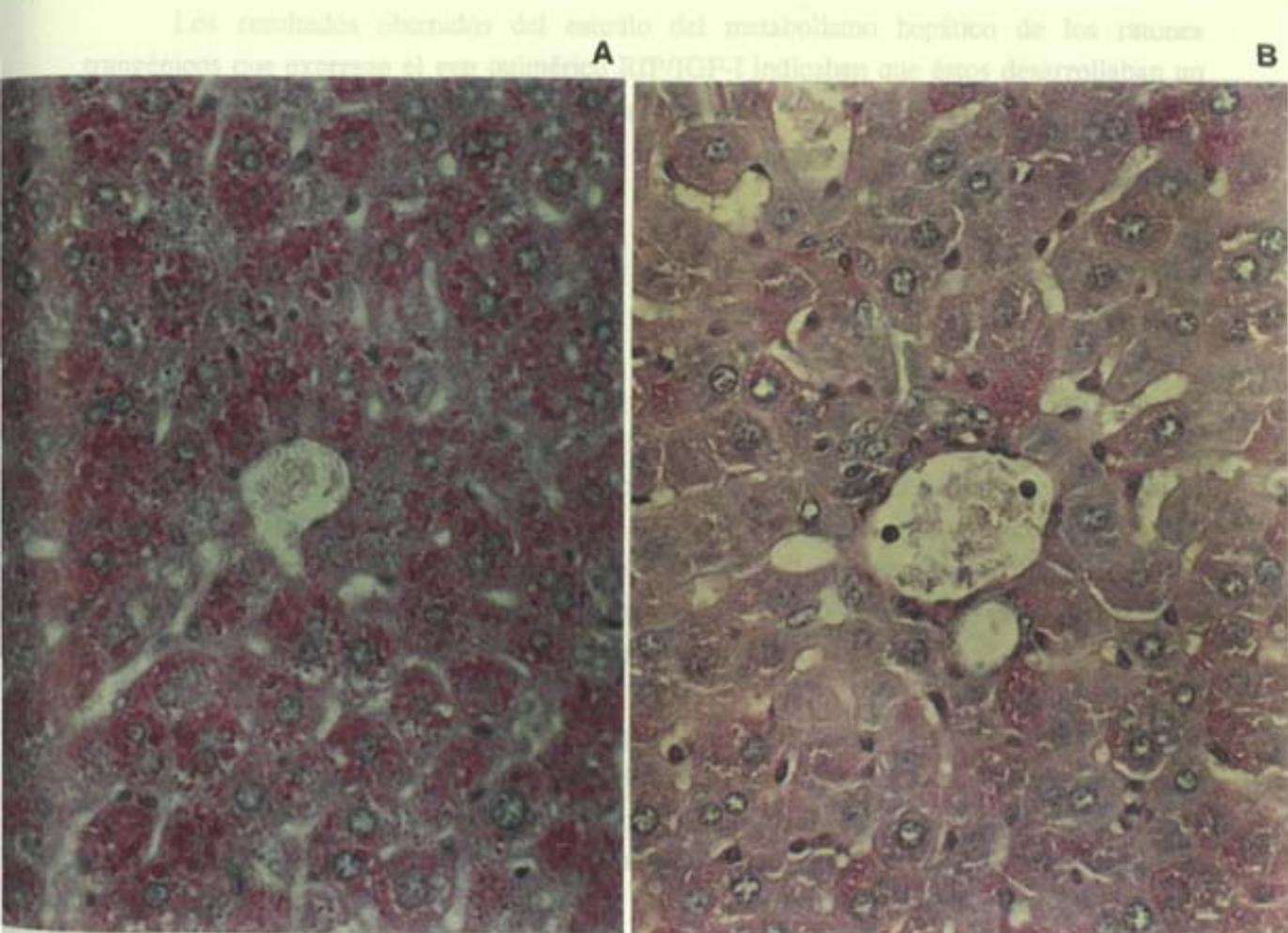


Figura 11. Detección de glucógeno en secciones histológicas de hígado. Se realizaron cortes histológicos de porciones de hígado de ratones controles (A) y transgénicos (B) alimentados y se llevó a cabo una tinción con ácido periódico de Schiff (PAS) que da coloración magenta al glucógeno (x100).

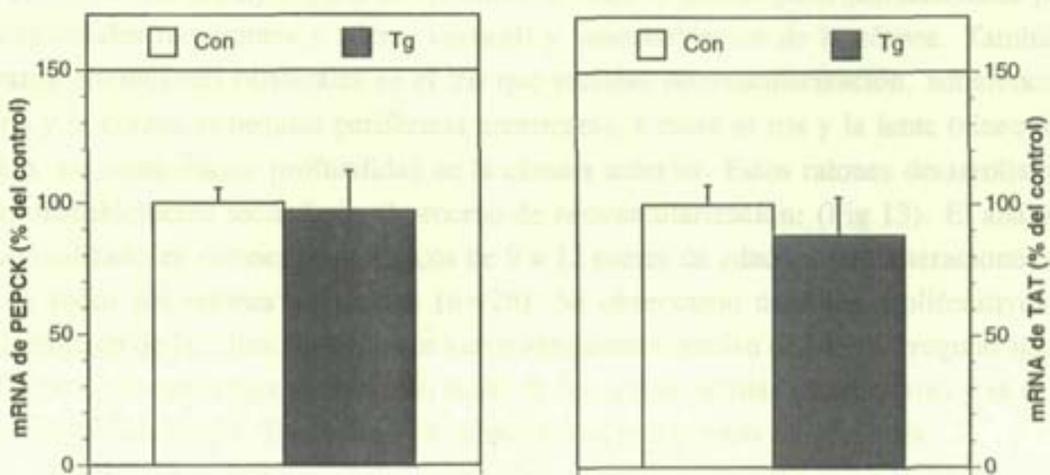


Figura 12. Expresión de los genes de la PEPCK y la TAT en hígado de ratones transgénicos RIP/IGF-I. 15 ratones transgénicos (Tg) y 15 controles (Con) fueron sacrificados y se aisló el hígado, que fue seguidamente congelado en nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se procesaron para la obtención de RNA total según se describe en Materiales y Métodos. Tras análisis por Northern Blot se hibridó con sonda específica para cada uno de los genes. Los resultados están normalizados con GAPDH y se expresan como porcentaje de expresión del gen en ratones control.

Los resultados obtenidos del estudio del metabolismo hepático de los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I indicaban que éstos desarrollaban un proceso de resistencia a la insulina en este órgano.

1.6. ALTERACIONES OCULARES EN LOS RATONES TRANSGENICOS QUE EXPRESAN EL GEN QUIMERICO RIP/IGF-I

Mediante los estudios realizados se pudo observar que los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I desarrollan un proceso de diabetes tipo II. En pacientes humanos, tanto la diabetes mellitus de tipo I como la de tipo II se caracterizan por el desarrollo de patología microvascular a nivel ocular y renal. En la patología ocular producida por la diabetes mellitus en el hombre son características la retinopatía, el glaucoma y las cataratas. Como consecuencia de ello, actualmente esta enfermedad es la causa más importante de ceguera en adultos (Ruderman y col., 1992).

Todos los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I desarrollaron las complicaciones oculares de la diabetes mellitus. Las hembras que habían criado mostraron las complicaciones más pronto que los machos. A los 6 meses de edad las hembras presentaban cataratas maduras, con opacificaciones completas de la lente. Sin embargo, las cataratas eran aparentes en los machos a los 9-12 meses de edad. Todos los ratones transgénicos estudiados desarrollaron cataratas bilaterales (n=32). Las cataratas incipientes fueron detectadas, mediante lámpara de hendidura, alrededor de los dos meses de edad en las hembras y de los 4 meses en los machos. Las opacidades variaban desde lesiones mínimas afectando únicamente la superficie posterior de la cápsula en los estadios más iniciales, hasta opacidad completa. En la mayor parte de los casos se observó queratopatía (caracterizada por erosiones epiteliales recurrentes y edema corneal) y vascularización de la córnea. También se observaron alteraciones bilaterales en el iris que incluían neovascularización, adherencias entre el iris y la córnea (sinequias periféricas anteriores), y entre el iris y la lente (sinequias posteriores), así como mayor profundidad de la cámara anterior. Estos ratones desarrollaban glaucoma, probablemente secundario al proceso de neovascularización. (Fig 13). El análisis histológico realizado en ratones transgénicos de 9 a 12 meses de edad mostró alteraciones en la retina de todos los ratones analizados (n=26). Se observaron cambios proliferativos y neovascularización de la retina. Los nuevos vasos sanguíneos crecían de forma irregular hacia el humor vítreo, causando desorganización focal de la capa de células ganglionares y la capa interna de células nucleares. En la Fig. 14 se pueden apreciar estas alteraciones.

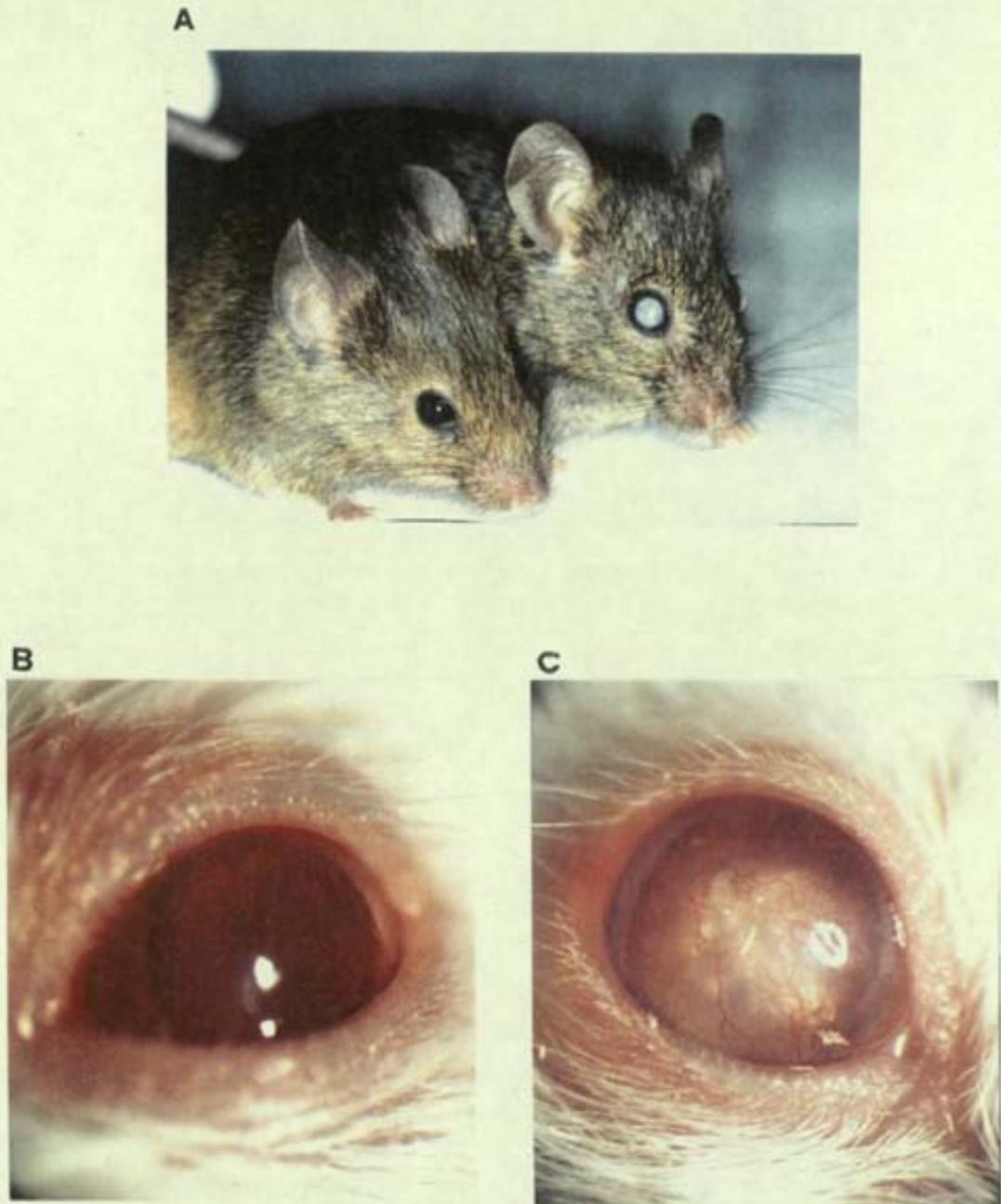


Figura 13. Alteraciones oculares de los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I. A) Ratón control (izquierda) y transgénico (derecha) de 12 meses de edad. El ratón transgénico presenta una catarata madura bilateral. Examen ocular mediante lámpara de hendidura de un ratón control de 9 meses de edad (B) y un ratón transgénico de la misma edad (C). El ojo del animal transgénico presentaba una opacificación completa de la lente, vascularización corneal, neovascularización del iris y queratopatía.

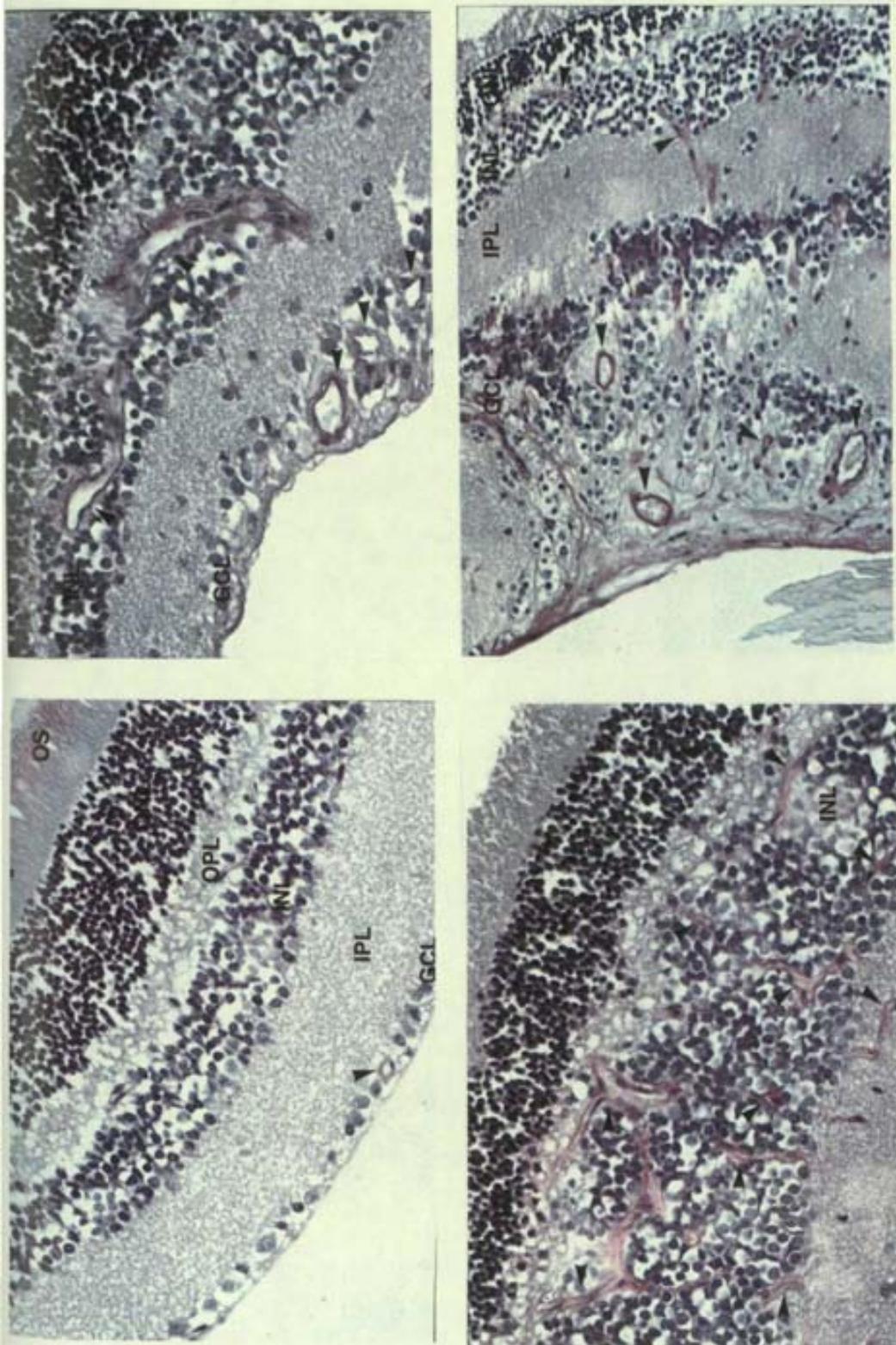


Figura 14. Estudio histológico de la retina de los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I. Secciones histológicas de retina de ratón control 9 meses de edad (x100) (A) y tres ratones transgénicos de esta misma edad (x100) (B,C), (x50) (D). Los animales transgénicos presentaban neovascularización de la retina. Las flechas muestran la formación de nuevos vasos y dilatación de las venas de la retina en la capa de células ganglionares y en la capa nuclear interna. Las secciones están teñidas con ácido periódico de Schiff y contraindicación con hematoxilina. (GCL) Capa de células ganglionares, (IPL) capa plexiforme interna, (INL) capa nuclear interna, (ONL) capa plexiforme externa, (OPL) capa nuclear externa, (OS) capa externa de conos y bastones.

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SOBREEXPRESION DE IGF-I EN CELULAS β DEL PANCREAS EN RATONES TRANSGENICOS

En la segunda parte del trabajo experimental de esta Tesis Doctoral, se ha llevado a cabo la obtención de un modelo de animal transgénico que sobreexpresa IGF-I en células β del páncreas. La hipótesis inicial estaba centrada en que el IGF-I pancreático podría muy probablemente regular la secreción de insulina a través de una acción autocrina y paracrina en el islote de Langerhans, ya que se había observado previamente que la infusión de IGF-I tenía un efecto inhibitor de la secreción de insulina (Leahy y Vanderkerkhove, 1990). Además, las células β del páncreas presentan receptores para este factor (Van Schravendijk y col., 1990).

El gen quimérico empleado en este trabajo estaba formado por el promotor de la insulina de rata I (RIP-I) fusionado al IGF-I murino. Al disponer únicamente del cDNA, se empleó un fragmento adicional del gen de la β -globina de conejo para asegurar la expresión del gen quimérico. Anteriormente, en nuestro laboratorio habíamos realizado este mismo tipo de aproximación para expresar genes de interés en células β del páncreas (Valera y col., 1994b). El fragmento del promotor de la insulina utilizado consistía en 510 pb. (-507 a +3) de la región 5' flanqueante del gen de la insulina de rata I. Este fragmento es suficiente para dirigir la expresión de genes marcadores de forma exclusiva a líneas celulares productoras de insulina y a las células β del páncreas en animales transgénicos (Edlund y col., 1985; Dandoy-Dron y col., 1991). A diferencia del gen de la insulina de rata II, que se expresa en determinadas células del sistema nervioso, el gen de insulina de rata I se expresa exclusivamente en las células β pancreáticas (Deltour y col., 1993). La porción de promotor empleada también contiene los elementos que le confieren capacidad de respuesta a glucosa y a AMP cíclico (German y col., 1990; Philippe y Missoten., 1990). Al comparar la expresión en rata de los genes endógenos de la insulina I y II, se ha observado una expresión 6 veces superior del I, mientras el gen II presenta una mayor regulación por glucosa (Wang y Rowe, 1988). Sin embargo, en nuestro laboratorio hemos comprobado que una dieta alta en carbohidratos provoca en animales transgénicos un incremento de expresión de GLUT2 antisentido cuando éste va unido a un fragmento de 510 pb del promotor RIP-I (Valera y col., 1994b).

Los ratones transgénicos fundadores fueron obtenidos mediante la técnica de microinyección de DNA a óvulos fecundados. Se establecieron dos líneas de animales transgénicos a partir de los animales fundadores 23 y 71. Estos fueron escogidos porque transmitían el carácter a la descendencia y por el alto (línea 23) y bajo (línea 71) número de copias del transgén integradas en su genoma. La línea de mayor número de copias era la que presentaba mayor cantidad de RNA mensajero de IGF-I en páncreas. También se pudo observar mediante Western Blot, que los animales transgénicos presentaban un incremento de IGF-I en islotes aislados. Además, la expresión de IGF-I en páncreas aumentaba en los

ratones transgénicos cuando eran alimentados con dieta alta en carbohidratos, lo cual indicaba que la expresión del transgén estaba regulada de manera similar al gen endógeno de la insulina. Así, tanto ratones controles como transgénicos respondían correctamente a la dieta alta en carbohidratos, pues se observaba un aumento de la expresión del gen de la insulina en ambos casos. Por el contrario, los animales controles alimentados con esta dieta presentaban una disminución de la expresión de IGF-I al compararlos con animales alimentados con dieta normal. Este resultado indicaba que el IGF-I endógeno del páncreas era regulado por la dieta y sugería que podía tener un papel fisiológico en este órgano.

Se ha propuesto que la concentración a la que el IGF-I endógeno actúa de forma autocrina y paracrina en el islote es muy baja (Clark y Chick, 1990). Por tanto, cabía esperar que la producción de IGF-I, resultante de la expresión del transgén, en los ratones de las líneas 23 y 71 alimentados con dieta estándar fuera suficiente para provocar cambios en el funcionamiento del islote. Por otro lado, muy probablemente los islotes de animales transgénicos secretarían poco IGF-I al exterior, ya que las propias células β , y también las células α , podían consumirlo, puesto que son ricas en receptores de este factor (Van Schravendijk y col., 1990). De acuerdo con estas premisas, se observó que los niveles de IGF-I sérico eran más bajos en animales transgénicos que en controles. Por otra parte, los animales transgénicos que sobreexpresan IGF-I en hígado presentan una elevación de 1,5 veces los niveles séricos de IGF-I, junto con un incremento del peso corporal y un marcado aumento de peso de los órganos (bazo, páncreas, cerebro y riñón) (Mathews y col., 1988). Los ratones transgénicos que sobreexpresan IGF-I en páncreas presentaban únicamente un incremento en el peso del páncreas y del bazo. Sin embargo, no presentaban variaciones en el peso corporal, ni tampoco del resto de los órganos estudiados (cerebro, hígado y riñón). Por tanto, el IGF-I producto del transgén actuaba únicamente en el órgano productor (páncreas) y en bazo, órgano situado junto al páncreas y muy sensible a la acción del IGF-I (Mathews y col., 1988). Estos datos indicaban que los ratones transgénicos producían IGF-I activo y que su acción tendría lugar de forma autocrina y paracrina en el propio páncreas.

Dado que los niveles de IGF-I sérico de los ratones transgénicos eran inferiores a los de sus hermanos control se analizó la expresión de IGF-I por el hígado, principal órgano productor del IGF-I circulante. Los niveles de mRNA de IGF-I en hígado de los animales transgénicos estaban claramente disminuidos, lo cual estaría de acuerdo con la disminución que se observa en modelos animales y pacientes de NIDDM. En todos ellos se observa una disminución de los niveles de IGF-I sérico (Graubert y col., 1991; Leaman y col., 1991; Bach y Rechler, 1992; Wang y col., 1995).

La hiperinsulinemia es característica de la NIDDM. Los animales transgénicos alimentados con una dieta normal presentaban un incremento de la insulina sérica. La cantidad de insulina que puede ser secretada por un individuo viene determinada, no sólo por la capacidad funcional de las células β , sino por el volumen total de estas células en el

organismo (Weir y col., 1990). Por otro lado, el IGF-I es un potente mitógeno que probablemente está implicado en el desarrollo de este órgano y de los islotes. Se ha detectado una importante expresión de este factor durante la embriogénesis (Serrano y col., 1990) y en islotes fetales (Romanus y col., 1985; Hill y col., 1987). Su presencia en el medio de islotes en cultivo estimula la proliferación de las células β de forma independiente a la GH (Ling y col., 1994). Al estar dirigida la expresión del transgén por el promotor de la insulina, muy probablemente el transgén se expresaba durante el período de embriogénesis (Gittes y Rutter, 1992). Mediante análisis morfométrico del páncreas se observó un incremento del área de célula β en los ratones transgénicos. Este incremento se correspondía con un aumento del número de islotes. Por otro lado, no había diferencias en el contenido de insulina de islotes aislados de los animales transgénicos y controles. Por tanto, la mayor proporción de célula β confería una mayor capacidad de secreción de insulina a los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I.

Se ha descrito que la ontogenia normal de las células β en páncreas se basa en la diferenciación de células del tejido ductal. El IGF-I producto del transgén podría promover la proliferación y diferenciación de células de los conductos hacia células β funcionales que den origen a nuevos islotes. Así, Smith y col. han descrito que tras pancreatectomía parcial aparecen focos de regeneración con abundante proliferación de los conductos pancreáticos. Los acinis e islotes pancreáticos se originaban a partir de estos conductos en un proceso semejante al de la neoformación de islotes en el período embrionario. Mediante la técnica de hibridación *in situ* han demostrado que los conductos pancreáticos expresaban IGF-I en las áreas de regeneración y que la cantidad de mRNA del factor se correlacionaba fuertemente con la proliferación de los conductos (Smith y col., 1991). El incremento en el número de islotes en los animales transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I estaría de acuerdo con este efecto local del IGF-I.

Los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I presentaban una mayor expresión del gen de la insulina y un incremento de los niveles circulantes de la hormona. Lo cual se ha observado en diferentes modelos de diabetes tipo II, como en las ratas GK (Onheda y col., 1993), el modelo de ratas inyectadas con estreptozotocina en el período neonatal (Chen y col., 1992) o los ratones ob/ob (Lavine y col., 1977).

Se ha observado que el IGF-I inhibe la secreción de insulina *in vivo* (Leahy y Vanderkerkhove, 1990; Guler y col., 1989). En los estudios de secreción de insulina de islotes aislados de ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I se observó un incremento de la secreción a concentraciones de glucosa de 2,8 y 5,5 mM y una reducción de la secreción a 16,7 mM. Además, la respuesta secretora a elevadas concentraciones de glucosa también estaba bloqueada en la primera y segunda fase de la secreción durante la perfusión de islotes de los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I. Estos resultados concordaban con los obtenidos por Kawai y col. (1990), que describieron que

la perfusión de IGF-I en páncreas aislado produce un efecto diferente sobre la secreción de insulina según la concentración de glucosa. Estos autores describieron que la respuesta a un incremento en la glucosa perfundida (de 4,5 mM a 12,8 mM) en presencia de IGF-I conducía a una clara inhibición de la secreción de insulina. Sin embargo, cuando se sometía el páncreas a una disminución de la concentración de glucosa (de 6,9 mM a 2,8 mM), no se observaba esta inhibición en presencia del factor (Kawai y col., 1990). Los experimentos de Leahy y Vanderkerkhove (1990) que muestran inhibición de la secreción por IGF-I en páncreas perfundido fueron realizados a concentración de glucosa alta de 7,8 mM. Sin embargo, en nuestro modelo animal no podemos descartar el efecto que un aumento en la concentración de glucosa tiene sobre la expresión del transgén a partir del promotor de la insulina. Por tanto, al aumentar la concentración de glucosa en el medio de cultivo se induciría la expresión del transgén, lo cual resultaría en un incremento local de los niveles de IGF-I. Estos podrían bloquear la secreción de insulina a altas concentraciones de glucosa actuando a diferentes niveles. Sin embargo, puesto que a concentración de glucosa de 20 mM los islotes de los animales transgénicos presentaban una gran reducción en los niveles de AMP cíclico y dado que se ha descrito que la activación de la proteína quinasa dependiente de cAMP parece ser un paso clave en la regulación de la secreción de insulina (Ashcroft, 1994), el bloqueo de la vía del cAMP por el IGF-I podría ser responsable de la disminución de la secreción de insulina tanto en la incubación estática de los islotes (90 min) como en la perfusión de los mismos. Así, se podría explicar, al menos en parte, el doble comportamiento de los ratones transgénicos. Alimentados con dieta normal presentaban niveles elevados de insulinemia y alimentados con dieta alta en carbohidratos eran hipoinsulinémicos.

La diabetes tipo II se define principalmente por ser un proceso de resistencia a la insulina, en el que generalmente se observa una elevación de la secreción de la hormona acompañada de hiperglucemia. El IGF-I sérico que tiene su origen a nivel hepático se encuentra generalmente disminuido en los pacientes con diabetes tipo II (Mercado y col., 1992). El estudio de los parámetros séricos de los ratones transgénicos era indicador de que los ratones desarrollaban este mismo proceso. Así, estos animales presentaban una ligera hiperglucemia y un incremento de los triglicéridos y los ácidos grasos no esterificados. Los ratones transgénicos también presentaban una reducción del IGF-I sérico. Además, los animales transgénicos mostraban una clara alteración del test de tolerancia a la glucosa. Por tanto, los animales transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I pueden ser considerados un nuevo modelo animal para el estudio de la diabetes tipo II.

Además, la NIDDM en el hombre se caracteriza por pérdida de la secreción de insulina estimulada por glucosa, sin alteración de la respuesta a otros secretagogos como la arginina (Ward y col., 1984). Sin embargo, la amplificación de la respuesta a otros nutrientes por parte de la glucosa está disminuida en pacientes diabéticos (Pfeiffer y col., 1981). Modelos animales de NIDDM como ratas macho ZDF diabéticas o ratas GK presentan el mismo patrón: una respuesta deficiente a la glucosa y una respuesta conservada a la arginina

(Jonhson y col., 1990; Ohmeda y col., 1993). Los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I no sólo presentaban una disminución de la secreción de insulina tras la incubación con elevadas concentraciones de glucosa, sino también, por aminoácidos metabolizables en presencia de glucosa. La disminución de la respuesta a la combinación de glucosa, leucina y glutamina en los animales transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I sugería que el IGF-I estaba actuando por un mecanismo general que afectaba la señal de todos los secretagogos metabolizables. Sin embargo, no mostraban alteración de la secreción de insulina en islotes aislados incubados en presencia de arginina. Todos estos resultados corroboraban que estos animales habían desarrollado un proceso diabético.

Numerosos factores hormonales reguladores de la secreción de insulina actúan a través del cAMP. El glucagón y las incretinas como GLP-1 y GIP activan la adenilato ciclasa, incrementando los niveles del nucleótido (Lu y col., 1993), mientras la somatostatina produce su efecto inhibitor de la secreción de insulina disminuyéndolos (Goke y col., 1989). Islotes aislados de los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I incubados en presencia de una concentración elevada de glucosa y forskolina, potente estimulador de la adenilato ciclasa, presentaron un marcado bloqueo de la secreción de insulina. El contenido de insulina de los islotes incubados en estas condiciones también estaba disminuido. Estos resultados indicaban que el IGF-I contrarrestaba la potente acción estimuladora de la forskolina sobre la adenilato ciclasa.

La insulina disminuye la concentración de cAMP en diferentes tipos celulares mediante mecanismos que implican tanto la inhibición de la síntesis por la adenilato ciclasa como la activación de la degradación por la fosfodiesterasa (Goldfine, 1981; Fain, 1984). Por este mecanismo la insulina antagoniza la acción de la adrenalina y el glucagón, aparentemente sin mediación de la proteína G_i (Gawler y col., 1988). Por otro lado, se ha estudiado muy poco el efecto del IGF-I en la vía de transducción de señal del cAMP. En células óseas en cultivo el IGF-I inhibe la producción de cAMP estimulada por la parathormona sin afectar el acoplamiento de G_{α} (Goad y Tashjian, 1993). Estos datos sugerían que el IGF-I que se produce en el islote podía actuar en la célula β de una manera similar a como se ha descrito para la insulina en los tejidos periféricos, contrarrestando la acción del glucagón mediante la disminución de los niveles de cAMP. Se considera que este segundo mensajero amplifica la respuesta insulinosecretora a la glucosa (Persaud y col., 1990). Por este motivo, se determinaron los niveles de cAMP en islotes incubados con concentración alta del azúcar. En esta condición los islotes de los ratones transgénicos presentaban una marcada reducción de los niveles de cAMP. Esta disminución también se observó al ser incubados en presencia de forskolina, IBMX (isobutilmetilxantina), o la combinación de ambos. Por tanto, todos estos datos sugerían que el IGF-I, al igual que la insulina, actuaba disminuyendo los niveles del nucleótido, por un lado mediante la inhibición de la adenilato ciclasa y por otro, mediante la estimulación de la fosfodiesterasa.

Los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I presentaban alteraciones de los parámetros séricos que se correspondían con un cuadro de resistencia a la insulina. El control de las vías glucolítica, gluconeogénica y de síntesis y degradación de glucógeno en hígado es clave en la regulación de la homeostasis energética del organismo. La glucoquinasa (GK) es un enzima clave en la captación de la glucosa en hígado. Su regulación se lleva a cabo principalmente a nivel transcripcional. Es estimulada por insulina e inhibida por glucagón (Iynedjian, 1993; Van Schaftingen, 1993). En diabetes mellitus de tipo II la resistencia a la insulina y el aumento de los niveles de glucagón provocan una reducción de la actividad GK. Tanto la expresión del gen de la GK, como su actividad enzimática, se hallaban disminuidas alrededor de un 40% en hígado de los animales transgénicos. Esta disminución se correlacionaba con una reducción significativa de los niveles intracelulares de glucosa 6-P. Estos datos indicaban que la captación de glucosa por el hígado estaba inhibida en los animales transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I, lo cual estaría de acuerdo con un cuadro de resistencia a la insulina. Por otro lado, la piruvato quinasa L (L-PK), enzima clave de la glucolisis, se regula a largo plazo por insulina, que estimula fuertemente la expresión del gen en presencia de glucosa (Vaulont y Kahn, 1994). A corto plazo, su actividad se regula mediante procesos de fosfo/defosforilación, de forma que su fosforilación por la proteína quinasa dependiente de cAMP la inactiva (Engström, 1978). En los ratones transgénicos se observó una clara disminución de la actividad enzimática de la L-PK, indicando que la glucolisis también estaba inhibida en estos animales. Así mismo, en los ratones transgénicos se apreciaba una reducción del contenido en glucógeno hepático, probablemente debido a un descenso de la actividad glucógeno sintasa, resultante de la disminución de la glucosa 6-P y de la resistencia a la insulina. A pesar de la hiperinsulinemia de estos animales, no se observaba una disminución en la expresión de los genes de enzimas claves en el control de la gluconeogénesis, la P-enolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la tirosina aminotransferasa (TAT), lo cual concordaría con la resistencia a la insulina observada en los modelos de diabetes mellitus no dependiente de insulina. Así, se ha descrito que la hiperglucemia en ayuno en pacientes con NIDDM es el resultado de un incremento en la gluconeogénesis hepática a pesar de la presencia de hiperinsulinemia (DeFronzo y col., 1989; Consoli y col., 1989; Magnuson y col., 1992). Así pues, todos estos resultados mostraban que los animales transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I desarrollan un cuadro de resistencia a la insulina a nivel del metabolismo de carbohidratos en el hígado. Estas observaciones están en concordancia con resultados de otros modelos animales como las ratas Zucker *fa/fa*, que presentan una falta de respuesta a la insulina en los procesos de gluconeogénesis y glucolisis hepáticas (Sánchez-Gutiérrez y col., 1994).

Por otra parte, los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I presentaron las complicaciones oculares de la diabetes: retinopatía, glaucoma y cataratas. Los mecanismos que conducen al desarrollo de las alteraciones oculares diabéticas no son bien conocidos, si bien se considera que la hiperglucemia es clave en el desarrollo de las

complicaciones secundarias de la enfermedad. En los tejidos expuestos a hiperglucemia, las alteraciones vasculares (vasodilatación, incremento del flujo sanguíneo) se asocian a un aumento de la relación NADH/NAD⁺. Este incremento, denominado pseudohipoxia por ser normal la presión parcial de oxígeno, es característico de la diabetes mal controlada y afecta la función vascular y neural de manera similar a la hipoxia real. Si bien se considera actualmente que la pseudohipoxia resultante de la hiperglucemia es la causa desencadenante de las complicaciones microvasculares (Ruderman y col., 1992), gran número de factores podrían estar implicados. Nuestros resultados parecen indicar que existe una conexión entre la producción de IGF-I en el islote y el desarrollo de la enfermedad ocular. Hemos obtenido en nuestro laboratorio otros modelos de animales transgénicos que desarrollan diabetes mellitus (ratones transgénicos que sobreexpresan el gen de la P-enolpiruvato carboxiquinasa en hígado y ratones transgénicos que expresan mRNA antisentido de GLUT2 en células β (Valera y col., 1994a,b)). Ninguno de ellos presenta las complicaciones oculares. Además, los modelos animales clásicos de IDDM y NIDDM, así como, animales transgénicos modelos de diabetes tipo I (Mordes y Rossini, 1990), no desarrollan tampoco las alteraciones oculares secundarias. Por otro lado, los pacientes humanos tratados con insulina desarrollan complicaciones secundarias y el tratamiento intensivo con la hormona únicamente retrasa la aparición y progresión de éstas. Nuestros resultados son consistentes con la hipótesis de que un factor desconocido podría ser producido por el islote diabético, en respuesta a un incremento local de IGF-I, el cual cooperaría con la hiperglucemia en el inicio de una cascada de eventos que darían lugar a las complicaciones a largo plazo de la diabetes. Experimentos adicionales podrían definir en el futuro la conexión entre los mecanismos moleculares que relacionan las alteraciones provocadas por el IGF-I en los islotes y aquellos responsables de las complicaciones oculares de la diabetes. Los animales transgénicos que expresan IGF-I en los islotes pancreáticos constituyen el primer modelo animal de diabetes que desarrolla espontáneamente las complicaciones secundarias humanas de la enfermedad y muy probablemente serán de gran utilidad para el estudio de los mecanismos que las producen.

PARTEII.CONCLUSIONES

- 1- Se han obtenido ratones transgénicos mediante microinyección del gen quimérico formado por el promotor de la insulina de rata I unido al IGF-I murino (RIP/IGF-I). Estos animales expresan IGF-I de manera regulada específicamente en las células β del páncreas.
- 2- Los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I son hiperinsulinémicos, hiperglucémicos, desarrollan un cuadro de resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y NIDDM.
- 3- La sobreexpresión de IGF-I en páncreas provoca un incremento del número de islotes de Langerhans en los ratones transgénicos, así como un incremento del área total de célula β y del peso del páncreas. Estos resultados sugieren que el IGF-I juega un papel estimulador de la neoformación de los islotes pancreáticos.
- 4- Islotes aislados de ratones transgénicos que sobreexpresan IGF-I secretan más insulina que islotes control a bajas concentraciones de glucosa (2,8 y 5,5 mM). Por el contrario, la secreción de insulina está disminuida en islotes de ratones transgénicos incubados a elevadas concentraciones del azúcar (16,7 mM).
- 5- Islotes aislados de ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I presentan en presencia de bajas concentraciones de glucosa una reducción de la secreción de insulina frente a la estimulación con la combinación de aminoácidos leucina/glutamina, mientras que conservan una secreción normal tras estimulación con arginina.
- 6- La mayor reducción de la secreción de insulina se produce cuando islotes aislados de ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I son incubados en presencia de forskolina a elevadas concentraciones de glucosa. A estas concentraciones de glucosa, se observa una disminución del contenido de cAMP en islotes aislados de ratones transgénicos.
- 7- Los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I presentan una reducción de la expresión del IGF-I hepático, así como, de los niveles séricos del factor. Este efecto es característico de diabetes tipo II.
- 8- Así mismo, se observa una reducción de la actividad de los enzimas glucoquinasa y piruvato quinasa, y una disminución de la concentración de glucosa-6-P y glucógeno en hígado. Por tanto, las alteraciones originadas por la sobreexpresión de IGF-I en los islotes del páncreas provocan resistencia a la insulina en hígado.
- 9- Los ratones transgénicos que expresan IGF-I en las células β pancreáticas desarrollan cataratas bilaterales, queratopatía y neovascularización de iris y córnea.

10- Mediante análisis histológico se observaron alteraciones proliferativas y de neovascularización de la retina de los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I.

11- Los ratones transgénicos que expresan IGF-I en las células β del páncreas constituyen el único modelo de diabetes mellitus tipo II que desarrolla espontáneamente las complicaciones secundarias de los pacientes humanos. Estos animales serán de gran utilidad para investigar los mecanismos mediante los cuales alteraciones en el funcionamiento de los islotes llevan al desencadenamiento de las complicaciones secundarias de esta enfermedad.

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES

1.1. Animales

Los animales empleados para la técnica de obtención de ratones transgénicos fueron ratones híbridos B6SJL, procedentes del cruce de las cepas C57BL/6 y SJL (IFFA CREDO), como donadores de zigotos, hembras receptoras CD-1 (Charles River) y machos vasectomizados OF-1 (IFFA CREDO).

Para la obtención de conejos transgénicos se utilizó la raza sintética IRTA, seleccionada por el IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, Torre marimón, Caldes de Montbui) según parámetros productivos, basada principalmente en animales de raza neozelandesa.

1.2. Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas fueron células de hepatoma de rata H4EII y de hepatoma humano HepG2. Se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) con 10% de suero fetal bovino.

1.3. Cepas bacterianas

La cepa de *E. coli* empleada para amplificar plásmidos fue la NM522. Las células de esta cepa se crecían a 37°C en medio LB, conteniendo 50 µg/ml de ampicilina cuando era necesaria para la selección de los plásmidos. Se conservaban a -80°C en medio LB conteniendo un 20% (vol/vol) de glicerol.

1.4. Sondas

Todas las sondas empleadas en este trabajo para el análisis por Northern Blot eran fragmentos de cDNA. La sonda de insulina correspondía al fragmento de 0,2 kb que se libera tras digerir el cDNA con *Pst*I, y fue cedida por el Dr. Rutter de la Universidad de California en San Francisco, CA, USA.

La sonda de glucoquinasa correspondía al fragmento de 2,3 kb que se libera tras digerir el cDNA con *Eco*RI, y fue cedida por el Dr. P. Lijnedjian de la Universidad de Ginebra, Suiza.

La sonda de piruvato quinasa L correspondía al fragmento de 1,6 kb que se libera tras digerir el cDNA con *Pst*I, y fue cedida por el Dr. A. Kahn, Institut Cochin de Genetique Moleculaire, INSERM, Paris, Francia.

La sonda de PEPCK correspondía al fragmento de 1,1 kb que se libera tras digerir el cDNA

con *Pst*I, y fue cedida por el Dr. R. Hanson de la Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA.

La sonda de TAT correspondía al fragmento de 0,6 kb que se libera de la zona 3' del cDNA al digerir con *Pst*I, y fue cedida por el Dr. G. Schultz del EMBL, Heidelberg, Alemania.

El resto de sondas fueron obtenidas a través de la American Type Culture Collection (ATCC) a partir de todo el cDNA suministrado. La sonda del cDNA del IGF-I murino correspondía al número 63070 de la ATCC.

1.5. Reactivos y medios de cultivo

Todos los reactivos de biología molecular se adquirieron a la firmas comerciales Boehringer Mannheim, Gibco-BRL, BioRad y Pharmacia. Los medios de cultivo de las líneas celulares eran de Gibco y el suero fetal bovino, la mezcla penicilina/estreptomicina y la tripsina de Boehringer Mannheim. Los productos marcados radiactivamente [α - 32 P]dCTP, U-[14 C]glucosa y el ensayo comercial de determinación de AMP cíclico *cAMP* [125 I] *assay system (dual range)* con referencia RPA 509 procedían de Amersham Internacional.

Las hormonas, PMSG y HCG, y el aceite de parafina para cultivo de embriones procedían de Sigma. Los reactivos químicos del medio de cultivo de embriones fueron adquiridos a Sigma y Merck. Los productos anestésicos de ratón eran de Aldrich (alcohol amílico terciario) y Sigma (tribromoetanol). Los productos empleados en la anestesia de los conejos procedían de Bayer (xilacina) y Rhône Mérieux (ketamina).

La collagenasa P de *Clostridium histolyticum* para la obtención de islotes pancreáticos era de Boehringer Mannheim. Las enzimas glucosa 6-P deshidrogenasa aislada de *Leuconostoc mesenteroides* y L-lactato deshidrogenasa fueron adquiridas a Boehringer Mannheim. Los reactivos generales (sales, ácidos, bases) se adquirieron en Merk.

2. METODOS

2.1. OBTENCION Y ANALISIS DE DNA

2.1.1. Preparación de DNA plasmídico

Para la obtención de pequeñas cantidades de DNA plasmídico se hacían minipreparaciones según el protocolo de lisis alcalina descrito originalmente por Birnboim y Doly (1979). El plásmido así obtenido (unos 3-4 $\mu\text{g/ml}$ de medio de cultivo), está mayoritariamente como forma circular cerrada covalentemente (*supercoiled*), y en general es susceptible de ser sometido a manipulaciones enzimáticas sin necesidad de purificaciones ulteriores.

El método consiste en una degradación de la pared bacteriana por la acción de la lisozima seguida por una lisis alcalina del esferoplasto y una precipitación selectiva del DNA genómico bacteriano y proteínas desnaturalizadas por acción de una solución concentrada de acetato potásico a pH ácido. El DNA plasmídico es purificado después mediante extracciones con fenol-cloroformo y precipitado con etanol. El RNA bacteriano es degradado mediante RNasa A.

Soluciones empleadas en el protocolo de lisis alcalina:

Solución de lisozima (preparación extemporánea)

Tris-HCl pH 8.0	25 mM
EDTA	10 mM
Glucosa	50 mM
Lisozima	5 mg/ml

Solución de lisis

NaOH	0.2 M
SDS	1%

Solución de acetato potásico pH 4.8

Acetato potásico	3 M
Acido acético glacial	2 M

La obtención de DNA de midipreparaciones y maxipreparaciones se realizaba por el método de lisis alcalina con posterior purificación del DNA plasmídico con columnas de Qiagen[®].

2.1.2. Obtención de DNA genómico

Para la extracción de DNA genómico empleado en la detección de los animales transgénicos mediante Southern blot, se siguió el método de De Wet y col. (1987) a partir de cola de ratón. Este método consiste en la obtención de DNA de un homogenado de cola de ratón en una solución tamponada que contiene proteinasa K y SDS, incubación a 55°C y purificación por extracción con fenol y fenol-cloroformo. Posteriormente, es precipitado con isopropanol y resuspendido en TE. El método empleado para la obtención de DNA genómico de conejo fue básicamente el mismo, partiendo de una porción de oreja de los gazapos.

Soluciones empleadas en el protocolo:

<u>Tampón de lisis</u> (preparación extemporánea)		<u>TE</u>	
Tris-HCl pH 8.5	100 mM	Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	5 mM	EDTA pH 8	1 mM
SDS	0.2% (p/vol)		
NaCl	200 mM		
Proteinasa K	100 µg/ml		

2.1.3. Resolución y purificación de fragmentos de DNA

La electroforesis en geles de agarosa es una técnica útil para la separación analítica o preparativa de fragmentos de DNA de tamaño superior a 100 pb. La visualización de los fragmentos de DNA resueltos se consigue mediante la incorporación al gel del colorante fluorescente bromuro de etidio (0.5 µg/ml) que se intercala entre las dos hebras del DNA y resulta en una banda anaranjada cuando son iluminados con luz ultravioleta de longitud de onda corta (300 nm). Esta técnica permite detectar fragmentos de hasta 5 ng de DNA.

La resolución de los geles de agarosa viene determinada por su concentración de agarosa, permitiendo discriminar entre bandas de tamaño molecular cercano mediante variaciones en su concentración. En este trabajo se utilizaron rutinariamente geles en tampón TAE cuya concentración de agarosa oscilaba entre el 0.6 y el 2%. Se emplearon los marcadores de peso molecular de DNA I al VII y el marcador de peso molecular de RNA III de Boehringer Mannheim.

El empleo de agarosas de bajo punto de fusión permite la utilización de los fragmentos de DNA sin necesidad de purificarlos. Para ello, se procede a la fusión del gel a 65°C, manteniéndolo a 37°C para impedir la gelificación de la solución. De este modo, el DNA queda preparado para la realización de posteriores modificaciones enzimáticas del DNA (principalmente ligaciones mediante DNA ligasa del bacteriófago T4 y marcaje de sondas radiactivas con el fragmento klenow de la DNA polimerasa I).

Tampón de electroforesis (TAE 1x)

Tris-acetato pH 8.3	40 mM
EDTA	1 mM

Tampón de carga 10x

Glicerol	50% (vol/vol)
EDTA	100 mM
SDS	1% (p/vol)
Azul de bromofenol	0.1% (p/vol)

La purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se llevó a cabo utilizando el producto comercial GENE CLEAN II[®] Kit (Bio 101 Inc., La Jolla, CA) básicamente según el protocolo de los suministradores.

2.1.4. Manipulación enzimática de DNA

Las endonucleasas de restricción, enzimas purificados a partir de bacterias u hongos, presentan una marcada especificidad respecto a secuencias cortas de DNA y actúan sobre ellas rompiendo los enlaces fosfodiéster y, por tanto, la cadena de DNA.

Cada enzima de restricción presenta requerimientos de fuerza iónica y condiciones de reacción específicas, por lo que en cada caso se siguió el protocolo recomendado por la firma suministradora. En general, se digería el DNA con una relación de 5 unidades de enzima por μg de DNA, sin exceder del 5% de glicerol en el tampón de restricción. Las digestiones de DNA plasmídico se realizaban durante 1-2 h., mientras, el DNA genómico se dejaba digiriendo durante toda la noche. Los productos de la restricción eran analizados en geles de agarosa/TAE.

2.1.5. Construcción de moléculas híbridas de DNA

Con el objeto de construir moléculas de DNA híbridas, los fragmentos de DNA de partida eran purificados, combinados y tratados con DNA ligasa del bacteriófago T4 suministrada por Pharmacia (Pharmacia-LKB, Uppsala, Suecia). Los productos de la mezcla de ligación eran introducidos en células NM522 de *E. coli* competentes y los transformantes identificados por selección genética u otros métodos, seguidos por confirmación mediante análisis del DNA plasmídico obtenido (Maniatis y col., 1989).

El protocolo de subclonaje de moléculas de DNA seguido variaba en cada caso particular.

siendo utilizadas las técnicas generales descritas anteriormente. Los vectores plasmídicos empleados fueron pBR327, pBS, pKCR3, pUC12, pSP65 y pTZ18.

Las células NM522 de *E. coli* usadas en este trabajo fueron hechas competentes mediante el método de Hanahan (1985h), que utiliza $MgCl_2$ y $CaCl_2$ como agentes permeabilizadores, procediéndose posteriormente a su transformación con los plásmidos deseados y posterior extensión sobre el medio selectivo adecuado, en nuestro caso LB en placa conteniendo $50 \mu g/ml$ de ampicilina. La amplificación posterior de los clones positivos se realizaba cultivando las células a $37^\circ C$ en volúmenes de 250 a 500 ml de LB/ampicilina.

LB (Luria-Bertrani Broth)

Triptona	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	5 g/l

2.1.6. Marcaje radioactivo de DNA

Como método de elección para el marcaje de sondas usadas en los Southern y Northern blot se empleó el preparado comercial *Random primed DNA Labeling Kit*, (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las sondas marcadas radiactivamente eran obtenidas incubando de 10 a 50 ng de sonda a $37^\circ C$ durante 1 h. con una mezcla de dATP, dGTP, dTTP y $[^32P]dCTP$ en presencia del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Esta técnica (Feinberg y Vogelstein, 1983), permite la síntesis de sondas de DNA de alta radioactividad específica ($1,8 \times 10^9$ dpm/ μg) y marcadas uniformemente. La separación de los nucleótidos no incorporados se conseguía mediante gel filtración en columnas de Sephadex G-50.

2.1.7. Análisis de DNA por Southern Blot (hibridación DNA-DNA)

Empleamos la técnica de Southern Blot de DNA genómico para determinar la presencia del gen exógeno en ratones y conejos transgénicos. Para asegurar la detección del gen quimérico, dado que el transgén se podía hallar como copia única, se empleaban $10 \mu g$ de DNA genómico digerido por carril en geles de agarosa/TAE. Esta elevada cantidad de DNA obligaba a realizar una depuración de los fragmentos sometidos a electroforesis con el fin de asegurar la transferencia al filtro de los fragmentos de alto peso molecular. Este paso se conseguía manteniendo el gel durante 20 min. en solución de HCl 0,25 N. A continuación, el DNA se desnaturalizaba manteniendo el gel 1 h. en solución alcalina (NaCl 1,5 M/NaOH 0,5 M) y otra hora en solución neutralizante (NaCl 1,5 M/Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5).

La técnica de transferencia utilizada para transferir el DNA genómico desde los geles de agarosa/TAE tratados a membranas de nylon era la transferencia capilar por presión negativa en

tampón de alta fuerza iónica (SSC 10x). Esta se realizaba mediante el sistema VacuGene (Pharmacia-LKB, Uppsala, Suecia), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El DNA se inmovilizaba a continuación, mediante luz ultravioleta con el sistema UV-Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, CA). Después de una prehibridación para reducir la hibridación inespecífica, la membrana se hibridaba con una sonda marcada radioactivamente (3 a 5 millones cpm/ml). Se lavaba para eliminar la sonda libre o débilmente unida y se procedía a la exposición autorradiográfica. El protocolo seguido en la prehibridación, hibridación y lavados con soluciones de decreciente fuerza iónica, fue básicamente el aconsejado por los fabricantes de las membranas de nylon (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania y NEN, Boston, MA). Las soluciones empleadas se describen a continuación.

Solución de prehibridación

SSCP	4x
SDS	1% (p/vol)
Solución de Denhardt	1x
DNA desnaturalizado de salmón	0,5 mg/ml

Solución de hibridación

SSCP	2,5x
Sulfato dextrano de sodio	6% (p/vol)
SDS	1% (p/vol)
Solución de Denhardt	1x
DNA desnaturalizado de salmón	0,5 mg/ml

SSCP 20x

Na Cl	2,3 M
Citrato sódico	0,3 M
Na ₂ HPO ₄	0,3 M
NaH ₂ PO ₄	0,1 M

SSC 10x

Na Cl	1,5 M
Citrato sódico	150 mM

Solución de Denhardt (50x)

Ficoll 400	1% (p/vol)
Polivinilpirrolidona 40.000	1% (p/vol)
BSA	1% (p/vol)

2.2. PREPARACION Y ANALISIS DE RNA

2.2.1. Preparación de RNA total

La preparación de RNA a partir de tejidos animales ricos en ribonucleasas, consta de un primer paso en el cual el tejido congelado en nitrógeno líquido y homogenizado hasta polvo fino es descongelado en un tampón conteniendo tiocianato de guanidinio y otros agentes desnaturizantes con el fin de inactivar las RNAsas. Le sigue una purificación mediante centrifugación en gradiente en CsCl y una posterior precipitación con etanol. En el caso de tejido pancreático empleamos preferentemente tejido fresco por obtenerse un RNA de mayor calidad.

Cuando el material de partida era cultivo celular, se añadió la solución desnaturizante directamente a la placa previa eliminación del medio de cultivo.

2.2.2. Electroforesis del RNA en geles desnaturizantes de agarosa/formaldehído

Este tipo de geles eran utilizados para el fraccionamiento del RNA en experimentos de Northern blot, ya que el formaldehído a concentración 2,2 M actúa desnaturizando las estructuras secundarias del RNA. Este hecho permite que la migración del RNA sea proporcional al logaritmo de su peso molecular y posibilita el cálculo del tamaño molecular de los diferentes mensajeros específicos. Los tampones de electroforesis y de carga, que se describen a continuación, debían ser preparados en condiciones libres de contaminación con ribonucleasas para evitar la degradación enzimática del RNA.

Tampón borato 10x pH=7.0

Borato sódico	62 mM
Acido bórico	620 mM
Citrato sódico	12 mM

Tampón de electroforesis

Tampón Borato	1 x
Formaldehído	3,7% (vol/vol)

Tampón de carga para RNA 3x

Metilmercurio	4.5% (vol/vol)
Glicerol	30% (vol/vol)
Azul de bromofenol	0.5% (p/vol)
SDS	1.5% (p/vol)
Tampón borato	0.5x

2.2.3. Análisis de RNA por Northern Blot (hibridación DNA-RNA)

Esta técnica consiste en la hibridación de una sonda de DNA o RNA marcada radioactivamente con RNA fraccionado en un gel desnaturante de agarosa y fijado a un filtro de nylon o nitrocelulosa.

La transferencia de RNA a la membrana es básicamente similar a la descrita para el caso de Southern blot, con la excepción de que el RNA no es nunca depurinado o desnaturizado con NaOH. En nuestro caso, las transferencias se realizaron empleando presión positiva mediante Posiblot (Stratagene, La Jolla, CA). Una vez finalizadas éstas, el filtro era irradiado con luz ultravioleta de onda corta para crear uniones covalentes del RNA con el nylon mediante el uso de UV-Stratalinker modelo 1800 (Stratagene, La Jolla, CA). El tamaño molecular de la banda de hibridación se calculaba mediante interpolación sobre una recta patrón realizada mediante marcadores de tamaño molecular de RNA fraccionados en el mismo gel y que posteriormente se habían teñido con bromuro de etidio.

El protocolo para la prehibridación, hibridación y lavados era el recomendado por la firma fabricante de las membranas de nylon, GeneScreenPLUS (NEN, Boston, MA), destacando la presencia de formamida desionizada en las soluciones de prehibridación e hibridación con objeto de incubar los filtros a una baja temperatura (42°C), ya que el RNA no puede ser calentado a altas temperaturas durante tiempo prolongado.

Solución de prehibridación e hibridación

Formamida desionizada	50% (vol/vol)
NaHPO ₄ pH 7	250 mM
NaCl	50 mM
EDTA	1 mM
BLOTTO	0,1% (p/vol)
SDS	1% (p/vol)
DNA desnaturizado de salmón	0.5 ng/ml

BLOTTO

Leche desnatada en polvo	10%
Azida sódica	0,002%

2.3. TECNICA DE ELECTROFORESIS DE PROTEINAS Y WESTERN BLOT**2.3.1. Preparación de extractos**

Los extractos eran obtenidos a partir de islotes aislados según el método descrito en el apartado 2.10.1.. Se formaron grupos de 180 a 200 islotes a partir de dos animales de cada condición y se sonicaron en una solución de SDS 5%, Tris-HCl 80 mM, pH 6,8, EDTA 5 mM, glicerol 10% (vol/vol) y PMSF 1 mM a 4°C. Una parte del extracto se empleaba para la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.

2.3.2. Método de Bradford

El método de cuantificación de proteínas introducido por Bradford (Bradford, 1976), está basado en el cambio producido en el espectro de absorción de ciertos colorantes como consecuencia de su adsorción sobre moléculas proteicas. Este método, con pocas interferencias, tiene una gran sensibilidad y amplios márgenes de linealidad en la reacción. Para su empleo, se siguió el protocolo detallado por el fabricante de la solución (Bio-Rad), empleándose como patrón BSA.

2.3.3. Separación electroforética, electrotransferencia e inmunodetección de las proteínas

El análisis de proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida del 12% en presencia de SDS (Laemmli, 1970). Las muestras (20 µg de proteína) eran mezcladas con 1/4 vol. de tampón de carga y calentadas a 95°C durante 4 min. La electroforesis y transferencia a membrana de nylon se llevó a cabo mediante el sistema Miniprotean II/Minitransblot de Biorad, siguiendo las instrucciones suministradas por el fabricante. Se emplearon como marcadores de bajo peso molecular los marcadores preteñidos de bajo peso molecular de Biorad (*Low Molecular Weight MW*).

Para la detección del IGF-I pancreático mediante el método de quimioluminiscencia se empleó un antisuero policlonal anti-IGF-I humano de GroPep, Australia, con dilución final de 1/1000. La técnica de inmunodetección empleada fue la de marcaje no radiactivo *ECL Western Blotting analysis*

system, Amersham, y se realizó siguiendo el protocolo de la casa comercial.

Tampón de electroforesis pH 8,3

Tris base	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0,1% (p/vol)

Tampón de carga 4x

Tris-HCl, pH 6,6	62,5 mM
Glicerol	10% (vol/vol)
SDS	2% (p/vol)
2-β-mercaptoetanol	5% (vol/vol)
azul de bromofenol	0,00125% (p/vol)

Tampón elactrotransferencia

Tris	25 mM
Glicina	150 mM
Metanol	20% (vol/vol)

2.4. EXPRESION EN CELULAS EN CULTIVO

La expresión de genes en células en cultivo mediante transfección transitoria de los vectores plasmídicos es una herramienta muy adecuada para comprobar la funcionalidad de los genes quiméricos antes de su microinyección. Las líneas celulares empleadas fueron H4EII y HepG2, que se cultivaron en placas de 11 cm de diámetro a 37°C en atmósfera controlada de 5% CO₂. Como medio de cultivo se empleó DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) con un 10% de suero fetal bovino. La transfección se realizó utilizando 16 µg de DNA por placa cuando las células se hallaban en un 50% de confluencia. El método utilizado para la transfección fue el de la precipitación de DNA con fosfato cálcico, incluyendo el choque con glicerol a las 4-6 horas de haberlas expuesto al precipitado (Current Protocols in Molecular Biology, 1989).

2.5. TÉCNICA DE OBTENCIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS

La técnica utilizada para la obtención de ratones transgénicos es la de microinyección de DNA en el pronúcleo masculino de ovocitos fecundados (Hogan, Constantini y Lazy, 1986; Yun y Wagner, 1989). A continuación, se expone con detalle la técnica llevada a cabo en nuestro laboratorio.

2.5.1. Preparación del DNA

La pureza del DNA a microinyectar es un factor muy importante para el éxito de la microinyección. El plásmido que contiene el gen de interés se preparó mediante columnas de Quiagen. El DNA fue digerido con los enzimas de restricción apropiados y sometido a electroforesis en un gel de agarosa/TAE. El fragmento de DNA deseado se aisló y purificó por electroelución siguiendo las instrucciones del kit comercial BIOTRAP BT 1000 (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania). Finalmente, se redisolvió en el tampón de microinyección de Brinster (10 mM Tris-HCl/0.2 mM EDTA pH7.5).

La concentración de DNA se determinó espectrofotométricamente y por separación en gel de agarosa/TAE, comparándolo con un marcador de peso molecular conocido. La concentración de DNA usualmente empleada para microinyección fue de 2 ng/ μ l (Brinster y col., 1985). Se obtuvo esta concentración realizando una dilución adecuada en tampón de microinyección y se conservó congelada. Antes de utilizarse, se centrifugó 10 min. a 13.000xg para evitar la presencia de partículas que pudieran taponar la pipeta de microinyección.

2.5.2. Recolección de los ovocitos fecundados

La técnica de microinyección se inicia con la superovulación de los ratones hembras donadoras, la recolección de los ovocitos fecundados, la selección de éstos para su posterior uso y la sincronización de hembras receptoras mediante la inducción de pseudogestación.

Para incrementar el número de óvulos recolectados, las hembras donadoras B6SJLF₁ eran superovuladas mediante la inyección de hormonas, las cuales se administraban en sincronización con ciclos de luz y oscuridad (Rugh, 1968). El protocolo comprendía la inyección intraperitoneal de 5 UI de PMSG, seguida de la administración de HCG, 48 h. más tarde. Estas hembras eran posteriormente cruzadas con machos de la misma cepa. La ovulación se producía 60 h después del inicio del tratamiento.

La obtención de hembras receptoras en estado de pseudogestación se realizaba cruzando hembras CD-1, escogidas por su carácter maternal, con machos vasectomizados OF-1. Para sincronizar su estado, este cruce se llevaba a cabo simultáneamente al de las hembras donadoras.

A la mañana siguiente, las hembras superovuladas eran examinadas y las que presentaban tapón vaginal se sacrificaban. Los oviductos se extraían quirúrgicamente. La ampolla del oviducto se rasgaba bajo lupa, liberando los óvulos a un medio de Brinster (Brinster, 1982) con hialuronidasa a la concentración de 1 mg/ml. Este tratamiento provocaba la eliminación de las células de la corona radiada. Los óvulos eran lavados mediante transferencia de los mismos en un medio libre de enzima con la ayuda de una pipeta de transferencia. Este proceso de lavado se repetía varias veces. Finalmente los cigotos se disponían en grupos de 10 a 15 y se transferían a diferentes gotas de medio de cultivo de Brinster sumergidas en aceite de parafina en placas de cultivo. Estas placas de cultivo son almacenadas y mantenidas a 37°C en una atmósfera de mezcla de gases (5% de O₂, 5% CO₂ y 90% N₂). El número de óvulos recolectados a partir de cinco o seis donadoras variaba de 120 a 180.

<u>Medio de Brinster-bicarbonato</u>		<u>Medio de Brinster-HEPES</u>
NaCl	94,5 mM	94,5 mM
KCl	4,78 mM	4,78 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,71 mM	1,71 mM
KH ₂ PO ₄	1,19 mM	1,19 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,19 mM	1,19 mM
NaHCO ₃	25 mM	-
HEPES	-	20.85mM
Lactato sódico	23,3 mM	23,3 mM
Piruvato sódico	0,33 mM	0,33 mM
EDTA	0,1 mM	0,1 mM
Glucosa	5,56 mM	5,56 mM
BSA	5 g/l	5 g/l
Penicilina G	100 U/ml	100 U/ml
estreptomina	50 µg/ml	50µg/ml
Rojo fenol	1%	1%

2.5.3. Descripción del Equipo de Microinyección

El sistema de microinyección incluye un microscopio invertido Axiovert 35M Zeiss, con micromanipuladores Leitz y pipetas de sujeción y de inyección conectadas a jeringas de control de la presión Alcatel (inyección) y Leitz (jeringa de sujeción tipo Hamilton). Este equipo propiamente de microinyección está localizado sobre una mesa antivibratoria de Technical Manufacturing Corporation, USA. Además se cuenta con un estirador vertical de pipetas David Kopf, USA, y una microforja Alcatel para la preparación de las micropipetas. Se emplea un estereomicroscopio Wild M 8, Leica Heerbrugg, de luz transmitida para la recolección de los óvulos. Otro estereomicroscopio Wild M 8

con iluminación directa incorporada es el que se utiliza para realizar la transferencia de los cigotos, una vez microinyectados, al oviducto de la hembra receptora.

2.5.4. Construcción de pipetas de microinyección y de sujeción

Para el éxito de la microinyección son necesarias micropipetas de buena calidad. En nuestro laboratorio preparabamos las micropipetas en cada jornada de microinyección a partir de capilares de vidrio de tipo Garner de 1 mm de grosor. Estos habían sido previamente siliconizados durante 30 min y secados en un horno de calor seco. De cada capilar estirado con el estirador vertical de pipetas obteníamos dos pipetas idénticas, las cuales eran modificadas para conseguir pipetas de sujeción o inyección. La temperatura óptima necesaria para elaborar estas pipetas había sido determinada experimentalmente.

Las pipetas de sujeción eran cortadas en la microforja colocándolas horizontalmente sobre una cama de vidrio unida al filamento de la microforja. Este se hacía tornar incandescente durante unos pocos segundos y al apagarlo provocaba la ruptura de la punta de la pipeta produciendo un extremo romo, siendo el diámetro aproximadamente de unos 50 μm . El diámetro de unos pocos micrómetros de la pipeta de microinyección se obtenía rompiendo la punta cerrada de ésta sobre el extremo romo de la pipeta de sujeción una vez colocadas las pipetas en los manipuladores. Anteriormente, se les había dado un ángulo de aproximadamente 15° a la punta de las pipetas mediante la colocación vertical de éstas junto a la fuente de calor de la microforja durante unos breves segundos. Este procedimiento se realizaba para corregir el ángulo con el que las micropipetas entraban en el campo del microscopio y de esta forma, poder enfocar en un mismo plano la porción de pipeta comprendida en el campo de visión.

2.5.5. Construcción de pipetas de transferencia

Se necesitan dos tipos de pipetas de transferencia: las pipetas gruesas y las finas. Las pipetas de transferencia gruesas tienen un diámetro interno de 200 a 400 μm , mientras que las finas tienen un diámetro de 120 a 150 μm . Las primeras se utilizan para transferir los óvulos de gota a gota de medio durante el proceso de lavado durante la recolección y tras la microinyección, mientras que las pipetas finas se utilizan para transportar los cigotos microinyectados al oviducto de la hembra receptora. Ambas pipetas se fabricaban manualmente estirándotas al fuego de un mechero tipo antorcha.

2.5.6. Portaobjetos y preparación para la microinyección

El portaobjetos empleado para la microinyección es una modificación del portaobjetos estándar

usado en microscopía óptica, al cual se le ha practicado un orificio de un área rectangular de 2.0 X 1.6 cm. En cada jornada se colocaba un cubreobjetos bajo el área seccionada del portaobjetos sellándolo con parafina fundida. Este tipo de cámara de microinyección es la que confiere mejor óptica porque es de base plana. Una gota (4 μ l) de medio de microinyección de Brinster (Brinster tamponado con HEPES) y una gota de DNA (2ng/ μ l disueltos en tampón de microinyección) eran depositadas alineadas verticalmente en el centro del portaobjetos de microinyección. Las dos gotas eran cubiertas en aceite de silicona. En este punto del protocolo, unos 25 ovocitos fecundados se transferían a la gota de medio.

2.5.7. Microinyección de los ovocitos fecundados

Inmediatamente antes de la inyección, la pipeta de microinyección se llenaba con fluido de silicona y se instalaba en el soporte del micromanipulador correspondiente. La pipeta de sujeción se instalaba en el otro micromanipulador y era posteriormente rellenada con aceite de parafina mediante la aplicación de presión sobre la jeringa de tipo Hamilton. Ambas pipetas se disponían en el ángulo necesario para la realización del proceso y se enfocaban las dos puntas a través del microscopio asegurando que ambas se encontraban alineadas horizontalmente.

La microinyección era llevada a cabo a 200 aumentos en la gota de medio con los cigotos, utilizándose un filtro verde para incrementar el contraste. La pipeta de microinyección se llenaba de DNA en la gota correspondiente y la pipeta de sujeción, tras haber absorbido un poco de medio, se empleaba para colocar y fijar los cigotos con el pronúcleo masculino accesible a la pipeta de inyección. Este proceso se realizaba girando el control de la jeringa de Hamilton para generar la presión negativa necesaria. Para microinyectar la solución de DNA se enfocaba la membrana del pronúcleo masculino y la punta de la pipeta de microinyección y se introducía ésta en la membrana pronuclear, inyectándose aproximadamente 2 pl de solución de DNA. Al observarse un aumento del tamaño del pronúcleo, se retiraba rápidamente la pipeta del óvulo dado que, si se continuaba inyectando, el óvulo se podría lizar. Una vez completado el proceso de inyección, los cigotos degenerados se descartaban y sólo se utilizaban para la transferencia aquellos que presentaban un aspecto normal. Estos se mantenían en una placa de cultivo para embriones a temperatura fisiológica hasta que eran transferidos a la hembra receptora.

2.5.8. Transferencia a la hembra receptora

Como receptoras se utilizaban hembras CD-1, de al menos 6 semanas, a las que se les había inducido un estado de pseudogestación. Las hembras cubiertas por machos vasectomizados que presentaban tapón vaginal eran separadas. Según el número de cigotos microinyectados y el número de hembras disponibles se realizaban de una a tres transferencias por jornada de microinyección. Estas se realizaban bajo anestesia mediante inyección intraperitoneal de 0.1 ml de Avertín (1g de

tribromoetanol y 0.6 ml de alcohol amílico terciario disueltos en 50 ml de solución salina fisiológica) por 5 g de peso vivo. Tras depilar un área de aproximadamente 1.5 X 1.5 cm a la altura de la zona lumbar y de esterilizar esta área con alcohol al 70%, se practicaba una incisión de 1 cm siguiendo el eje longitudinal del animal y se separaban los labios de la herida para localizar el ovario o el acúmulo de grasa de la bolsa ovárica a través de la pared abdominal. Una vez localizados, se practicaba una segunda incisión justo por encima de la zona y se extraía la masa ovárica (ovario y bolsa ovárica) del lado correspondiente pinzando y estirando de la grasa asociada a la bolsa ovárica.

Una vez la masa ovárica estaba fuera de la cavidad abdominal y orientada adecuadamente, se rasgaba la bolsa ovárica con dos pinzas de relojero y se localizaba el infundíbulo. Con ayuda de la pipeta fina de transferencia, se introducían de 10 a 12 óvulos microinyectados al interior del infundíbulo. La masa ovárica era introducida a la cavidad abdominal y todo el proceso se volvía a repetir en el otro costado. Después de haber transferido los cigotos a ambos oviductos, la incisión de la piel se cerraba con grapas.

Las hembras se recuperaban y aproximadamente a los 20 días llevaban a término la gestación. Durante el mes siguiente de lactancia se mantenían tranquilas y bajo control para evitar que dañaran a las crías.

2.5.9. Establecimiento de las líneas de transgénicos

Los animales nacidos a partir de cigotos microinyectados eran destetados al mes de edad, se separaban por sexos y se identificaban por color y mediante orificios en las orejas. Se realizaba una extracción del DNA genómico de estos animales y se analizaba mediante el método de Southern Blot para detectar la presencia del DNA exógeno.

Los identificados como positivos eran cruzados con animales de la misma cepa híbrida originaria (B6SJL) para transmitir el nuevo carácter a la descendencia. De esta forma, se podía establecer a partir de cada animal transgénico una colonia de animales con los que realizar los estudios o aplicaciones que nos habíamos propuesto.

2.6. OBTENCION DE CONEJOS TRANSGENICOS

La técnica utilizada para la obtención de conejos transgénicos es la de microinyección de DNA en el pronúcleo masculino de ovocitos fecundados. Esta técnica ha sido desarrollada en nuestro laboratorio y por tanto, está incluida en el apartado de resultados.

2.7. ANALISIS DE LOS ANIMALES

Los ratones controles y transgénicos empleados se encontraban en condiciones de temperatura controlada y sometidos a un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (de 8 a 20 h.). En general, los animales empleados tenían edades comprendidas entre los 3 a 6 meses, considerándose en edad adulta. En determinadas experiencias se tuvo especial cuidado en emplear animales de una determinada edad y en cada caso se especifica. Todos los experimentos se realizaron de 9 a 12 h. de la mañana en animales alimentados. De no especificarse, la dieta empleada era dieta normal de laboratorio (Panlab[®], Barcelona). La dieta alta en carbohidratos utilizada provenía de Nutritional Biochemical Corp., Cleveland, Ohio y contenía sacarosa 80,5%, caseína 10,2%, DL-metionina 0,3%, aceite de semilla de algodón 4%, extracto de levadura 2%, mezcla de minerales AIN 3,5% y mezcla de vitaminas 1%.

Los conejos utilizados se alojaban en la granja experimental del IRTA en Torre Marimón, Caldes de Montbui, y estaban alimentados con una dieta elaborada por Corena[®] para conejos de producción. La toma de muestras de los conejos también se realizó en las primeras horas de la mañana. La edad de los animales se especifica en cada experiencia.

2.8. DETERMINACION DE PARAMETROS SERICOS

Para la obtención del suero de ratón los animales eran sacrificados por decapitación e inmediatamente se recogía la sangre en tubos mantenidos a 0°C. El suero se obtenía tras dejar coagular la sangre durante 30 minutos a 0°C. El coágulo se separaba mediante centrifugación a 2000xg durante 15 minutos. El suero se mantenía congelado a -20°C hasta el momento de la determinación de los diferentes parámetros.

La extracción de sangre en el conejo se realizó a partir de la vena auricular empleando jeringas de insulina.

2.8.1. Determinación de metabolitos en suero

2.8.1.1. Glucosa

La glucemia se determinó a partir de 30 µl de sangre extraída de animales sangrados por la cola mediante el sistema Reflotrón[®] de Boehringer Mannheim.

2.8.1.2. Triglicéridos

Los triglicéridos séricos se determinaron siguiendo el método enzimático de Wahlefeld (1974) basado en la cuantificación del cromógeno PAP. Este es obtenido a partir de tres reacciones acopladas en las que intervienen la glicerol quinasa, la glicerol 3-fosfato oxidasa y la peroxidasa. Se empleó el ensayo Peridochrom[®] Triglicéridos GPO-PAP, adaptado por Boehringer Mannheim para el COBAS BIO.

2.8.1.3. Ácidos grasos no esterificados (NEFAs)

La determinación de los ácidos grasos no esterificados en suero se realizó mediante el método enzimático NEFA C de la firma comercial Wako Chemicals, Neuss, Alemania, adaptado al autoanalizador COBAS BIO. Se basaba en la cuantificación de un cromógeno obtenido tras el acoplamiento de tres reacciones en las que intervienen la Acil-CoA sintetasa, la Acil-CoA oxidasa y la peroxidasa.

2.8.1.4. Colesterol

Los niveles de colesterol sérico se determinaron por el método de la colesterol oxidasa descrito por Siedel y col. (1983) empleando el ensayo comercial Monotest[®] Colesterol de Boehringer Mannheim para el autoanalizador COBAS BIO.

2.8.2. Determinación de actividades enzimáticas en suero**2.8.2.1. Actividad fosfatasa alcalina**

La determinación de la actividad fosfatasa alcalina en suero se realizó utilizando el ensayo comercial ALP MPR I de la firma comercial Boehringer Mannheim adaptado para el análisis en un autoanalizador COBAS BIO de Roche. La técnica se basa en la medida de la velocidad de aparición de p-nitrofenol, producto de defosforilación del sustrato p-nitrofenilfosfato por el enzima.

2.8.3. Determinación de hormonas en suero y medios de cultivo e incubación**2.8.3.1. Hormona de crecimiento humana**

La hormona de crecimiento humana se determinó en suero y medios de cultivo por el método de radioinmunoensayo mediante el kit comercial de BioMérieux (Marcy-l'Étoile, France). Es un sistema IRMA que utiliza dos anticuerpos monoclonales, obtenidos en ratón. El coeficiente de variación intraensayo es de 5,2%. La sensibilidad es de 0,25 ng/ml.

2.8.3.2. IGF-I

El IGF-I sérico se determinó por método de radioinmunoensayo mediante Kit comercial del Nichols Institute Diagnostics (San Juan Capistrano, CA). El estándar está calibrado frente al WHO IRP IGF-I 87/518. Se utiliza un anticuerpo policlonal obtenido en conejo. La valoración se realiza tras extracción del plasma con ácido-etanol (87% etanol y 12% de HCL). La sensibilidad es de 0,3%.

2.8.3.1. Insulina

La insulina se determinó por radioinmunoensayo en suero y en medios de incubación de islotes aislados (CIS Biointernational, Gif-Sur-Yvette, Francia). El método tiene un límite de sensibilidad de 30 pM y una variación intraensayo del 6%.

2.9. PESO DE LOS ANIMALES Y DE LOS ORGANOS

Ratones de 94 días de edad fueron anestesiados en una campana con éter anestésico y pesados en una balanza de precisión Sartorius 1474 para determinar el peso vivo. Posteriormente, se sacrificaron por decapitación y se desangraron. Los distintos órganos se obtuvieron quirúrgicamente, se pesaron en una balanza de precisión Mettler AJ100 y se fijaron en formol al 10%.

Los conejos se pesaron en una báscula a los 30 días de edad, en el destete, y a los 60 días, una vez finalizado el período de engorde. A los 6 meses y medio de edad se pesaron de nuevo para determinar el peso adulto.

2.10. MORFOMETRIA DEL PANCREAS

Los páncreas de ratones de 94 días de edad se fijaron mediante solución estándar de formol durante 24 horas. Se inclusionaron en parafina con un inclusor tipo Histokinette y se obuvieron las secciones con la ayuda de un microtomo. Las secciones de 2 a 3 μ m de espesor fueron posteriormente desparafinadas. La inmunohistoquímica se llevó a cabo mediante la técnica de de inmunoperoxidasa indirecta. El primer anticuerpo empleado fue un anticuerpo policlonal anti-insulina porcina producido en cobayo (suministrado por Dako), a una dilución de 1/100 en PBS. La incubación de las muestras con el primer anticuerpo se llevó a término a 4°C durante toda la noche y se finalizó con tres lavados con PBS. En este punto se aplicó como segundo anticuerpo un policlonal anti-IgG de cobayo producido en conejo, al cual se le unió el enzima peroxidasa suministrado por Dako a una dilución 1/50 en PBS. Tras la incubación se lavó tres veces en PBS y se añadió el cromógeno (DAB). Se incubó y tras una serie de lavados se procedió a la contratinción con hematoxilina, dejándose secar las muestras en la estufa a 37°C durante unas horas.

Mediante la inmunodetección de insulina se delimitaba el área de células β del páncreas. El % de célula β del páncreas se calculaba dividiendo el sumatorio de las áreas que presentaban positividad a la insulina en una sección de páncreas por el área total de la sección y multiplicando esta relación por 100. La medida de las áreas se realizó mediante un analizador de imágenes. El área de la sección se determinó a 18,75 aumentos y el área de los islotes se determinó a 33 aumentos. Se calibró el sistema para obtener los resultados en milímetros y micrómetros, respectivamente. Para evitar variaciones según las diferentes zonas del páncreas, se analizaron tres secciones de cada órgano separadas un mínimo de 150 μm (diámetro medio aproximado de un islote de ratón).

2.11. ESTUDIO DE FUNCIONALIDAD DE LOS ISLOTES PANCREATICOS

2.11.1. Obtención de islotes aislados de ratón

Los islotes pancreáticos se obtuvieron de ratones alimentados de 3 a 6 meses de edad. Los animales se sacrificaron por decapitación, tras ser anestesiados con éter, y se accedió a la cavidad abdominal. El páncreas de cada animal se perfundió con 2 ml de solución de Hanks (NaCl 137 mM, KCl 5,36 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,81 mM, Na_2HPO_4 0,34 mM, KH_2PO_4 0,44 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,26 mM, NaHCO_3 4,17 mM) con colagenasa P (2 mg/ml) mediante canulación del colédoco bajo lupa binocular. Se extrajo por disección y se conservó en hielo hasta su digestión. Los páncreas fueron digeridos a 37°C en grupos de uno, dos o cuatro, dependiendo del experimento, en una solución de Hanks con colagenasa P de 3 mg/ml. La digestión se paró añadiendo Hanks frío (4°C) y se realizaron cuatro lavados de 5 minutos con esta solución. Los islotes se aislaron manualmente del tejido exocrino aspirándolos con una pipeta de vidrio siliconizada bajo un estereomicroscopio. Se cuidó de mantenerlos a 0°C hasta el momento de la experimentación.

2.11.2. Secreción de insulina

De los diversos sistemas *in vitro* de estudio de la secreción de insulina que existen, se escogió el de islotes aislados. Este permite evaluar el efecto de diversas sustancias sobre la célula β , manteniendo su conexión con el resto de células endocrinas del islote. Frente al sistema de perfusión del órgano pancreático, presenta la ventaja de establecer la secreción de insulina por islote, evitando las variaciones en número de islotes por páncreas que podrían presentar los modelos transgénicos de estudio.

Las técnicas empleadas para el estudio de la secreción de insulina de islotes aislados fueron la de incubación estática y la de perfusión.

2.11.3. Incubación estática

Esta técnica consiste en la incubación de islotes con distintas concentraciones de glucosa u otros secretagogos con el fin de conocer la cantidad de insulina secretada en respuesta a estos estímulos en un período de tiempo determinado.

La incubación se realizó con grupos de 6 islotes en una solución tampón (NaCl 0,46 M, NaHCO₃ 96 mM, KCl 20 mM, MgCl₂ 4mM, CaCl₂ 4 mM, BSA 0,5% (p/vol)) en un baño metabólico en agitación a 37°C durante 90 minutos. Durante los 10 primeros minutos se gasearon con una mezcla de carbógeno (95% O₂:5% CO₂). Una vez finalizada la incubación se recuperó el medio de incubación y se congeló a -20°C para la posterior determinación de la insulina por RIA.

2.11.4. Perifusión

La técnica de perifusión tiene la particularidad de someter a un grupo de islotes contenidos en una cámara de incubación a un flujo continuo de solución con distintas concentraciones de secretagogo. La solución de salida es recogida cada minuto para la medida de la insulina secretada. De este modo se obtiene el patrón de respuesta al estímulo a lo largo del tiempo.

Realizamos el experimento de perifusión con grupos de 75 islotes contenidos en una cámara de incubación, que se sometieron durante 90 minutos a dos concentraciones de glucosa a la temperatura de 37°C. La solución de glucosa 5,5 mM se aplicó durante los primeros 45 min. y la de 16,7 mM los 30 minutos siguientes, finalizando la incubación con la primera solución. Cada minuto se recogió con un colector de fracciones 1 ml de solución de salida que se congeló a -20°C para la determinación de insulina.

2.11.5. Contenido de insulina

El contenido de insulina se mide por RIA a partir de un extracto de islotes. Posteriormente a la incubación estática de los islotes, una vez se hubo extraído la solución de incubación, se obtuvo el extracto añadiendo 1 ml de solución ácido-alcohol (etanol 75% vol/vol, HCl 10 N 1,5% vol/vol) y sonicando la muestra a 4°C.

2.11.6. Contenido de AMP cíclico

La medida del contenido de cAMP de los islotes se realiza mediante la determinación del nucleótido por la técnica de RIA en extractos ácidos de islotes. La técnica que empleamos es la desarrollada por Stainer y col. (1972) y descrita por Sjöholm (1991) en su adaptación para islotes

pancreáticos. Los extractos se obtuvieron a partir de 30 islotes incubados (según las condiciones descritas en el apartado de resultados) en un volumen de 100 μ l de solución de incubación, a los cuales se les añadió 50 μ l del TCA necesario para obtener una concentración final del 6%. Inmediatamente después se sometieron a una centrifugación de 30 seg. a 13,000xg y se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido. Las muestras se conservaron a -80°C hasta el momento del análisis. En este punto las muestras se descongelaron mediante ultrasonidos a 4°C y se centrifugaron a 2000xg durante 15 min. a 4°C . El sedimento se resonó en 300 μ l de agua destilada para la medida de DNA (4°C). El sobrenadante se lavó 4 veces con 5 volúmenes éter dietílico saturado con agua y el extracto acuoso se secó completamente mediante speed vac. Este se resuspendió en el tampón de ensayo y se determinó el cAMP por RIA siguiendo el protocolo del ensayo comercial de Amersham. Con el fin de incrementar la sensibilidad del método las muestras fueron acetiladas (Harper y Brooker, 1975).

2.12. ESTUDIO DE PARAMETROS METABOLICOS EN HIGADO

Para la determinación de diferentes parámetros metabólicos hepáticos se sacrificaron por decapitación ratones transgénicos y controles alimentados con dieta normal y el mismo número de animales alimentados con dieta alta en carbohidratos. El hígado de cada animal se fraccionó en cinco porciones de aproximadamente 100 mg cada una. Una de ellas se homogenizó (Polytron) en fresco en tampón de homogenado para la determinación de actividad glucoquinasa. Otra se fijó en solución estándar de formol para su análisis histológico. Las restantes porciones de hígado se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta su utilización.

2.12.1. Determinación de actividad glucoquinasa

Para la determinación de la actividad glucoquinasa se siguió el protocolo descrito por Newgard y col. (1983) basado en la determinación del ritmo de aparición de NADH. Éste es proporcional al de fosforilación de la glucosa por la glucoquinasa y la hexoquinasa gracias al acoplamiento de la reacción con la de formación, a partir de la glucosa 6-P producida, de 6-fosfogluconato mediante la acción de la glucosa 6-P deshidrogenasa. Para la obtención del extracto de hígado, en el cual se medía la actividad enzimática, se homogenizaron las muestras de hígado en 5 vol. de tampón de homogenado y se centrifugaron a 29000xg un mínimo de 20 min. a 4°C . El sobrenadante fue extraído y se realizó la medida de la actividad enzimática a 37°C en un autoanalizador COBAS BIO a alta concentración de glucosa (100mM) y posteriormente a baja concentración del azúcar (0,5 mM). Las determinaciones se realizaron por duplicado. Finalmente, el cálculo de la actividad glucoquinasa se llevó a cabo mediante la resta de la actividad observada a concentración de glucosa 100 mM y la obtenida en presencia de glucosa 0,5 mM. A esta última concentración de glucosa únicamente se podía determinar la actividad hexoquinasa I, debido a la baja Km de esta enzima en comparación a la elevada Km de la glucoquinasa (alrededor de 10 mM).

<u>Tampón de homogenado (pH 7,4)</u>		<u>Mezcla de ensayo (pH 7,4)</u>	
Tris	50 mM	Tris	100 mM
KCl	100mM	KCl	100 mM
EDTA	1 mM	MgCl ₂	7,5 mM
Sacarosa	300mM	ATP	5 mM
β-mercaptoetanol	10 mM	NAD ⁺	2 mM
		G6-PDH	5 U/ml
		Glucosa	100 mM o 0,5 mM

2.12.2. Determinación de actividad piruvato quinasa

La determinación de actividad piruvato quinasa se realizó siguiendo el método descrito por Feliu y col. (1977), introduciendo las modificaciones de Gil y col. (1987). Este método consiste en determinar las variaciones de concentración de NADH en un medio de incubación en presencia de fosfoenolpiruvato (PEP). Este por acción de la piruvato quinasa se transforma en piruvato, que a su vez es transformado a lactato por la acción de la lactato deshidrogenasa. La determinación se realizó a partir de extractos de hígado obtenidos a partir de muestras congeladas. Estas se politronaron en 10 vol. de tampón de homogenado y se centrifugaron a 29000xg 20 min. a 4°C. A continuación, se determinó la actividad enzimática presente en el sobrenadante mediante el autoanalizador COBAS BIO. El ensayo se realizó a 30°C en presencia de dos concentraciones diferentes de PEP, la de 0,15 mM, que permitía determinar la actividad de la enzima alrededor de su Km por el sustrato, y la de 5 mM, con la que se expresaba la actividad total.

<u>Tampón de homogenado (pH 7,4)</u>		<u>Mezcla de ensayo (pH 7,4)</u>	
Glicilglicina	50 mM	Glicilglicina	50 mM
KF	100 mM	KCl	100 mM
EDTA	15 mM	NADH	0,2 mM
KH ₂ PO ₄	5 mM	MgCl ₂	10 mM
		ADP	1,25 mM
<u>Segundo reactivo</u>		KH ₂ PO ₄	5 mM
PEP	5 mM o 0,15 mM	L.DH	2 U/ml

2.12.3. Determinación de glucosa 6-P

La determinación de los niveles intracelulares de este metabolito la estableció Michal (1974) basándose en la reacción de la enzima glucosa 6-P deshidrogenasa. Esta transforma la glucosa 6-P en 6-fosfogluconato, a la vez que reduce el NAD⁺ a NADH, que puede ser detectado por el espectrofotómetro.

Para la obtención del extracto, fracciones de hígado fueron pesadas y politronadas en 10 vol. de HClO₄ al 10%. Posteriormente se centrifugaron a 29000xg durante 15 min. a 4°C para la extracción del sobrenadante. Se ajustó a pH 7 el extracto obtenido mediante la adición de K₂CO₃ junto 1/10 vol. de solución de indicador universal. Se centrifugaron de nuevo las muestras en las condiciones anteriores para eliminar el precipitado de KClO₄. La determinación del metabolito en el sobrenadante se realizó a 37°C en un autoanalizador COBAS BIO empleando la mezcla de ensayo que se indica a continuación.

<u>Mezcla de ensayo (pH 7.4)</u>		<u>Segundo reactivo</u>
Tris-HCl	90 mM	G6-PDH 30 U/ml
MgCl ₂	25 mM	
NAD ⁺	1,2 mM	

2.12.4. Determinación de glucógeno

El polisacárido se determinó mediante la técnica descrita por Keppler y Decker (1984) basada en la utilización del enzima α -amiloglucosidasa. La glucosa liberada por la enzima fue determinada espectrofotométricamente en un autoanalizador COBAS BIO con la ayuda de un ensayo comercial Gluco-Quant[®], de Boehringer Mannheim. Esta determinación se basa en una técnica que utiliza hexoquinasa-glucosa 6-fosfato deshidrogenasa descrita por Bergmeyer y col. (1974).

Para la obtención del extracto de hígado se politronaron fracciones de hígado en 10 vol. de HClO₄ al 10%. El homogenado se centrifugó a 6000xg durante 5 min. y se recogió el sobrenadante. Éste se ajustó a pH 5 mediante la adición de K₂CO₃ junto 1/10 vol. de solución de indicador universal. De cada muestra se tomaron 100 μ l, a los que se añadieron 100 μ l de solución α -amiloglucosidasa (10 U/ml) en tampón acetato 0,4 M a pH 4,8, y otros 100 μ l que se incubaron en presencia de la misma cantidad de tampón acetato 0,4 M a pH 4,8. La incubación se llevó a cabo durante 2 horas a 50°C y se paró la reacción añadiendo 250 μ l de HClO₄ al 10%. La determinación de la glucosa se realizó en el sobrenadante obtenido de centrifugar las muestras 15 min. a 29000xg a 4°C.

La cantidad de glucógeno se estimó con la diferencia de concentraciones de glucosa de las muestras duplicadas incubadas en presencia y ausencia de α -amiloglucosidasa. La glucosa determinada en ausencia del enzima es indicadora de la concentración intracelular de glucosa libre.

2.13. ANALISIS HISTOLOGICO

Las muestras de los distintos órganos de ratón y conejo se fijaron mediante solución estándar de formol neutro (tamponado con fosfato) al 10% durante 24 horas. Se inclusionaron en parafina con un incluser tipo Histokinette y se obtuvieron las secciones con la ayuda de un microtomo. Las secciones de 2 a 3 μm de espesor fueron posteriormente desparafinadas. La tinción empleada rutinariamente era la de hematoxilina/eosina. La reacción de ácido periódico de Schiff (PAS) era empleada para la detección de glucógeno en secciones de hígado. Con esta tinción el glucógeno adquiere un color magenta. También se empleó la tinción de PAS para secciones de riñón y retina, pues reacciona con el componente de polisacáridos de la membrana basal, que tiñe de color magenta. En los casos que se consideró oportuno delimitar el tejido conjuntivo presente en las preparaciones se empleó una tinción tricrómica de Masson. Ésta tiñe los núcleos de azul oscuro-negro, el citoplasma, el músculo y los eritrocitos de color rojo y el colágeno azul verdoso (Bancroft y Stevens, 1982).

2.14. ESTUDIOS OCULARES

La observación de los ojos de los ratones se realizó a 375 aumentos empleando una lupa con lámpara de hendidura Zeiss SL-M. Con anterioridad a la observación se aplicaba un mínimo de tres veces, en intervalos de 15 min., una gota de atropina al 1% a los dos ojos de los ratones. Para realizar el examen ocular los animales fueron anestesiados con Avertín.

2.15. CALCULO ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como media \pm SEM. En caso de no especificarse, la comparación de resultados se realizó mediante t de Student de datos no apareados. El análisis estadístico realizado para la comparación de los resultados obtenidos de los dos conejos transgénicos fundadores respecto la población control fue el de análisis de varianza.