



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EFFECTO DE LA PROLACTINA *IN VIVO* SOBRE EL  
TAMAÑO DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS Y EL  
CONTENIDO DE INSULINA PANCREÁTICA EN RATAS  
SPRAGUE-DAWLEY

**EDGARD FABIAN BONETT BOULDRE**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Animales.

**PROFESOR GUIA: ILLANI JEANNE ATWATER**

SANTIAGO – CHILE  
2008



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



EFFECTO DE LA PROLACTINA *IN VIVO* SOBRE EL  
TAMAÑO DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS Y EL  
CONTENIDO DE INSULINA PANCREÁTICA EN RATAS  
SPRAGUE-DAWLEY

**EDGARD FABIAN BONETT BOULDRE**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias Biológicas  
Animales.

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : ILLANI ATWATER	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: RAQUEL CEPEDA	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: GUSTAVO FARIAS	.....	.....

SANTIAGO – CHILE  
2008

## INDICE.

<b>INDICE.</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.</b>	<b>v</b>
<b>RESUMEN.</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY.</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN.</b>	<b>3</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.</b>	<b>5</b>
1. Conceptos generales.	<b>5</b>
2. Alternativas terapéuticas.	<b>7</b>
3. Adaptación de los Islotes de Langerhans a la gestación.	<b>9</b>
4. Efectos de la PRL sobre los islotes de Langerhans <i>in Vitro</i> .	<b>10</b>
5. Efecto de la prolactina ovina (PRL <sub>o</sub> ) sobre los islotes de Langerhans.	<b>11</b>
<b>OBJETIVOS.</b>	<b>12</b>
1. Objetivo general.	<b>12</b>
2. Objetivos específicos.	<b>12</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>13</b>
1. Lugar y período del estudio.	<b>13</b>
2. Animales y alojamiento.	<b>13</b>
3. Tratamiento con PRL <sub>o</sub> .	<b>13</b>
4. Sacrificio de las ratas.	<b>14</b>
5. División y procesamiento de los páncreas extraídos.	<b>14</b>
6. Obtención del contenido de insulina de páncreas.	<b>15</b>
7. Medición del tamaño y número de los islotes de Langerhans.	<b>15</b>
7.1. <i>Inclusión de trozos de páncreas en parafina.</i>	<b>15</b>
7.2. <i>Inmunohistoquímica.</i>	<b>16</b>
7.3. <i>Microfotografías de los cortes de páncreas.</i>	<b>17</b>

7.4. <i>Medición del tamaño de los islotes de Langerhans.</i>	18
7.5. <i>Cuantificación del número de islotes de Langerhans.</i>	18
8. Análisis de la distribución según el tamaño de los islotes de Langerhans.	19
9. Análisis Estadístico.	19
10. Reactivos.	21
<b>RESULTADOS.</b>	<b>22</b>
1. Efecto del tratamiento con PRLo sobre el porcentaje de área ocupada por islotes y sobre la densidad de islotes.	22
2. Medición del contenido de insulina.	26
2.1. <i>Medición del contenido de insulina por gramo de páncreas.</i>	26
2.2. <i>Medición del contenido de insulina en el total del páncreas.</i>	27
3. Distribución de los islotes de Langerhans según su tamaño.	30
3.1. <i>Distribución de los islotes de Langerhans en la región de la cabeza.</i>	30
3.2. <i>Distribución de los islotes de Langerhans en la región de la cola.</i>	32
<b>DISCUSIÓN.</b>	<b>34</b>
1. Efecto del tratamiento con PRLo sobre el tamaño y la densidad de los islotes de Langerhans.	34
2. Efecto del tratamiento de PRLo sobre el contenido de insulina.	35
3. Efecto del tratamiento con PRLo según sexo.	36
4. Efecto de la duración del tratamiento con PRLo.	37
5. Efecto del tratamiento de PRLo sobre el número de islotes de Langerhans.	37
6. Efecto del tratamiento de PRLo sobre la distribución de los islotes de distinto tamaño.	38
<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>39</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b>	<b>40</b>
<b>ANEXOS.</b>	<b>44</b>
Anexo 1: Protocolo de Inmunohistoquímica.	44

## **AGRADECIMIENTOS.**

Quiero agradecer al laboratorio de Neuroendocrinología y Cirugía experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile por permitirme realizar mi memoria de pregrado. Especialmente a mi profesora guía, Illani Atwater, por el apoyo y confianza que me otorgó durante la realización de mi investigación. También al personal del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, al Laboratorio de cultivo celular del profesor Pablo Cavieres, y al programa de Morfología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por facilitarme sus dependencias para trabajar.

Además, quiero agradecer a todas las personas que me ayudaron de una u otra forma a realizar y llevar a cabo este trabajo durante sus distintas etapas, por brindarme su amistad y talento; a Cristian Arriagada, David Mears, Fernando Crespo, Paola Llanos, Pablo Oteíza, Edna Mancilla, Víctor H. Parraguez, Andrea Mahn, Pedro Martínez, Maria Angélica Morales, Juan Carlos Soto Campos, Juan Carlos Soto Zúñiga, Daniela Parrau, Alexis Umeres, Diego Elgueda y a mis compañeros de laboratorio. Finalmente deseo dar las gracias en especial a mi familia, por su apoyo y confianza en todo momento.

*Dedico esta memoria de título  
a mis padres, hermanos y mascotas.  
Y en forma especial a Corina Jeréz y Mony (QED).*

## RESUMEN.

La Diabetes Mellitus (DM) es una de las enfermedades crónicas de mayor incidencia y prevalencia en las sociedades occidentales. Su tratamiento mediante la administración de insulina exógena presenta diversas dificultades como la imposibilidad de regular correctamente la glicemia. Por esto, la búsqueda de nuevos agentes con potencialidad terapéutica es de suma importancia. Numerosos estudios han sugerido que la presencia de la hormona prolactina (PRL) en cultivos de islotes de Langerhans *in vitro* induce un aumento tanto en el tamaño de los islotes como en su capacidad de producir insulina. A pesar de estos antecedentes, aún no existen reportes sobre este fenómeno en condiciones *in vivo*. Como una forma de analizar el efecto de la PRL sobre los islotes de Langerhans en animales vivos, en la presente memoria se administraron inyecciones de prolactina ovina (PRLo) a ratas *Sprague-Dawley*. Posteriormente, se midieron diferentes parámetros morfológicos y funcionales de los islotes de Langerhans. El tratamiento con PRLo indujo un aumento significativo del porcentaje de área ocupada por los islotes (PAOI), el cual se concentró exclusivamente en la cabeza del páncreas. Nuestros resultados concuerdan con los datos observados en experimentos *in vitro*, sugiriendo así un efecto directo de la PRL sobre los islotes de Langerhans, posicionándola como una posible alternativa terapéutica en la lucha contra la DM.

## **SUMMARY.**

Diabetes Mellitus (DM) is a chronic disease with a very high incidence and prevalence in occidental societies. Its treatment by means of exogenous insulin administration is very difficult due to the impossibility of regulating blood glucose levels accurately. Therefore, the search for new agents with therapeutic potential is extremely important. Numerous studies have suggested that the presence of the hormone prolactin (PRL) in cultured islets of Langerhans *in vitro* induces an increase in their size and in their capacity to produce insulin. In spite of this data, there are no reports about this phenomenon *in vivo*. In this thesis work, we administered ovine prolactin (PRL<sub>o</sub>) injections to *Sprague-Dawley* rats in order to analyze the effect of PRL on islets of Langerhans in live animals. We measured different morphologic and functional parameters from islets of Langerhans. The treatment with PRL<sub>o</sub> induced a significant increase in the percentage of area occupied by islets (PAOI). Our results agree with the data observed in experiments *in vitro*, suggesting a direct effect of PRL on islets of Langerhans. These observations indicate that PRL could be a possible therapeutic alternative in the fight against DM.



## INTRODUCCIÓN.

La Diabetes mellitus (DM) es una enfermedad prevalente en el mundo, la cual está en aumento en todos los países, provocando invalidez y disminuyendo las expectativas de vida de la población, produciendo un importante gasto para los servicios de salud y un costo social para las familias. La administración parenteral de insulina ha sido la terapia empleada por más de siete décadas para tratar la DM tipo 1 (insulinodependiente) y tipo 2, cuando en esta última los antidiabéticos orales ya no son efectivos para estimular la liberación de insulina. Sin embargo, debido a que no se ha podido imitar la forma precisa en que el páncreas secreta dicha hormona, comúnmente se presentan alteraciones en la glicemia que a largo plazo dañan a otros órganos, lo que ha propiciado la búsqueda de nuevos tratamientos. El trasplante de islotes de Langerhans puede ser una forma más segura y sencilla de restaurar la producción endógena de insulina que el trasplante del páncreas completo, ya que existen complicaciones potencialmente fatales que son causadas por el tejido exócrino del páncreas. Es por eso, que en la actualidad el trasplante de islotes resulta ser una terapia atractiva. En los últimos años, muchos pacientes con DM tipo 1 han logrado un mejor control de las fluctuaciones en la glicemia después de un trasplante de islotes de Langerhans. Sin embargo, el insuficiente número de islotes obtenidos de un donante, impide que este tipo de trasplante sea utilizado masivamente, ya que se necesitan varios donantes para lograr una independencia de la insulino terapia en el individuo receptor.

Numerosos estudios han sugerido que la presencia de PRL en el medio de cultivo de islotes de Langerhans *in vitro*, induce una proliferación de las células

$\beta$ , observándose también un aumento en la producción de insulina. Sin embargo, no se han descrito estudios que prueben este efecto en experimentos *in vivo*. Por lo cual, se propuso como hipótesis que: **el tratamiento con altas dosis de PRL produce en las ratas un aumento significativo del contenido pancreático de insulina y del tamaño de los islotes de Langerhans**. En base a esta propuesta, el objetivo del presente trabajo consistió en: **determinar los efectos de altas dosis de PRL sobre el tamaño de los islotes de Langerhans y su contenido de insulina pancreática en ratas *Sprague-Dawley***. Puesto que, no se han descrito estudios similares en seres vivos, los resultados de este estudio podrían dar un punto de partida para crear un tratamiento con PRL en pacientes post-transplantados con islotes de Langerhans o para pacientes que padecen DM tipo 2.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

### 1. Conceptos generales.

El **páncreas** esta formado por dos tipos principales de tejidos: 1) El páncreas exócrino, que está formado por los acinos pancreáticos, cuya función es secretar enzimas digestivas al duodeno, y 2) el páncreas endocrino, compuesto por los **islotos de Langerhans**, cuya función es secretar hormonas a la sangre (Guyton y Hall, 1996). El volumen de los islotes de Langerhans comprende del 1 a 2% del tejido pancreático (Haro-Hernández y Méndez, 2002; Srinivasan *et al.*, 2007). Estos contienen cuatro tipos principales de células:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , y PP, que se distinguen entre sí por sus características morfológicas y tintoriales. Las **células  $\beta$** , que constituyen aproximadamente el 60% de todas las células, están situadas principalmente en el centro de cada islote y secretan insulina. Las células  $\alpha$ , que constituyen aproximadamente el 25% del total, secretan glucagón. Las células  $\delta$ , alrededor de un 10% del total, secretan somatostatina. Las células PP ó F, que comprenden una escasa cantidad, y secretan una hormona denominada polipéptido pancreático (Guyton y Hall, 1996). En las ratas se ha reportado que no hay una distribución homogénea de las células endocrinas dentro de los islotes de Langerhans en las diferentes regiones del páncreas (Hughes *et al.*, 2005). En el mono Cercopiteco Verde (*Cercopithecus aethiops*) se observó que el porcentaje de células  $\beta$  va disminuyendo desde la región de la cola hacia la región de la cabeza (Louw *et al.*, 1997), pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, esta tendencia es similar a la distribución reportada en la rata, ratón, cerdo y humano (Louw *et al.*, 1997; Hughes *et al.*, 2005).

La **insulina** es una hormona polipeptídica sintetizada exclusivamente por las células  $\beta$  pancreáticas y cumple la función de regular de manera muy precisa los niveles de glucosa sanguínea, actuando principalmente sobre hepatocitos, adipocitos y células del músculo estriado, para favorecer la captación de glucosa. Además, posee una actividad anabólica, favoreciendo la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas (Haro-Hernández y Méndez, 2002).

La **Diabetes Mellitus** (DM) es un trastorno metabólico de etiología múltiple, caracterizado por hiperglicemia crónica debido a alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas, a consecuencia de defectos en la secreción de insulina, acción de la hormona o de ambos (García de los Ríos, 2003).

La DM se clasifica según su etiología en:

- **DM Tipo 1:** producida por una destrucción de las células  $\beta$  por una causa autoinmune o desconocida (Nielsen *et al.*, 1999; García de los Ríos, 2003). Este tipo de diabetes se inicia principalmente en la población menor de 20 años de edad (Gartner y Hiatt, 2002).
- **DM Tipo 2:** producida por un déficit relativo de la producción de insulina y una deficiente utilización periférica de la glucosa por los tejidos, fenómeno conocido como resistencia a la insulina (Nielsen *et al.*, 1999; García de los Ríos, 2003).
- **Otras:** Por mal funcionamiento de las células  $\beta$  o por un defecto de la producción de insulina (drogas, defectos genéticos).

- DM gestacional: producida sólo durante la gestación, aparece en un 2 a 5 % de las embarazadas y desaparece después del parto (García de los Ríos, 2003).

## **2. Alternativas terapéuticas.**

La administración parenteral de insulina ha sido la terapia empleada por más de siete décadas para el tratamiento de la DM tipo 1 y para los pacientes con DM tipo 2, cuando en estos últimos el tratamiento con sulfonilureas ya no es efectivo para estimular la liberación de insulina. Sin embargo, debido a que los tratamientos tradicionales no han podido imitar la forma tan precisa en que el páncreas secreta insulina, comúnmente se presentan alteraciones a largo plazo que dañan a otros órganos internos, lo que ha propiciado la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento (Haro-Hernández y Méndez, 2002).

Aunque el transplante de páncreas puede en principio restablecer la homeostasis de la glucosa, persisten profundas controversias sobre su uso como una técnica de rutina. Los riesgos del procedimiento quirúrgico, la pérdida del injerto, la cistitis química, la infección urinaria, la calidad de vida bajo la terapia de inmunosupresión que exige la toma diaria y el control estricto de ciclosporinas, lo que se estaría cambiando una enfermedad, “la diabetes” por otra, “la inmunosupresión” (Ruso, 1999). Todo esto hace que este procedimiento no constituya la mejor alternativa de tratamiento (Adamec, 2003). El **transplante de islotes** frente al transplante de páncreas, aunque también requiere de inmunosupresión, tiene ventajas como ser una técnica mínimamente invasiva, (Kendall *et al.*, 2001; Kandaswamy y Sutherland, 2006;

Balibrea del Castillo *et al.*, 2007), con escasísima morbilidad, nula mortalidad y con un costo económico previsiblemente menor (Balibrea del Castillo *et al.*, 2007), constituyendo un promisorio y razonable método alternativo para restaurar la normoglicemia y aliviar las complicaciones a largo plazo de la DM (Kendall *et al.*, 2001; Papas *et al.*, 2001). En este procedimiento, los islotes son extraídos del páncreas del donante y embolizados directamente al hígado por la vena porta (Rosenberger *et al.*, 1999; Balibrea del Castillo *et al.*, 2007). A pesar de que actualmente los resultados del trasplante de islotes son cada vez más esperanzadores, para que esta técnica sea utilizada masivamente debe primero superar algunos problemas. Una de las principales dificultades de esta técnica es que durante este proceso muchos islotes resultan dañados, ya sea por el proceso de digestión del páncreas exócrino, así como por el procedimiento de embolización de los islotes a la vena porta, produciendo una pérdida de un 30% de islotes en el mejor de los casos. Por esta razón, se requiere obtener islotes de 2 a 5 donantes para revertir la DM de un receptor. Además, en muchos pacientes se requiere hacer un segundo trasplante (Kendall *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2005; Balibrea del Castillo *et al.*, 2007) aumentando el costo y los riesgos de procedimiento (Srinivasan *et al.*, 2007). Independientemente a la pérdida de islotes durante el período de aislamiento, hoy se sabe que la mayoría de las pérdidas se producen después de hacer el implante (Balibrea del Castillo *et al.*, 2007).

Resulta evidente pensar, que si se encontrara la forma de estimular la proliferación de las células  $\beta$  induciendo la recuperación de la masa celular inicial, a partir de una población disminuida en el paciente transplantado o al

menos hacer posible la recuperación parcial de la función pancreática en el paciente con DM, su tratamiento sería más prometedor, puesto que se evitarían complicaciones a largo plazo que la administración de insulina exógena no es capaz de prevenir (Haro-Hernández y Méndez, 2002).

### **3. Adaptación de los islotes de Langerhans a la gestación.**

En condiciones normales las células  $\beta$  tienen un índice de regeneración de solamente un 3% por día en el individuo adulto y disminuye con la edad. Aunque es una cifra muy baja, esta resulta suficiente para sostener una población celular que produzca y secrete insulina en cantidad apropiada para satisfacer su demanda en individuos sanos (Haro-Hernández y Méndez, 2002). Durante el período de gestación, sin embargo, se producen una serie de cambios adaptativos que incluyen: 1) un incremento de la división de células  $\beta$  (Brelje *et al.*, 1993; Sorenson *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 1999) y del volumen de los islotes de Langerhans (Sorenson *et al.*, 1993); 2) Reducción del umbral de estimulación de la glucosa con el consecuente aumento de la secreción de insulina; 3) Incremento de la síntesis de insulina (Brelje *et al.*, 1993; Sorenson *et al.*, 1993; De Mazancourt *et al.*, 2001). Existen antecedentes que indican que las hormonas lactogénicas (PRL y lactógeno placentario) son las responsables de inducir estos cambios en los islotes de Langerhans (Parsons *et al.*, 1992; Sorenson *et al.*, 1993; Andrews *et al.*, 2001; Atwater *et al.*, 2002). Si se produce una insuficiente respuesta de los islotes maternos al incremento de la demanda de insulina, puede desarrollarse una diabetes gestacional (Parsons *et al.*, 1992, Sorenson *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 1999).

#### **4. Efectos de la PRL sobre los islotes de Langerhans *in Vitro*.**

La PRL es una hormona polipeptídica secretada por la adenohipófisis, es considerada una citoquina y se le han descrito más de 300 funciones (Goffin *et al.*, 2002), entre las que se incluyen: funciones reproductivas, inmunomoduladoras, osmoreguladoras, del crecimiento y desarrollo, endocrinas y conductuales (Parraguez y Sales, 1993; Goffin *et al.*, 2002).

Hace más de 20 años se reportó la presencia de PRL en las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans de ratas adultas, proponiéndose su acción directa sobre el páncreas endocrino (Meuris *et al.*, 1983).

Los niveles plasmáticos de PRL en la rata fluctúan en el día entre 5-30 ng/ml, y pueden llegar hasta un *peak* de 80 ng/ml en la noche (Loeb y Quimby, 1989). En la etapa intermedia de la gestación los niveles plasmáticos de PRL se elevan significativamente llegando a niveles de 200 a 300 ng/ml (Parsons *et al.*, 1992; Ben-Jonathan *et al.*, 1996; Andrews y Grattan, 2003). Esto concuerda con un aumento de la secreción de insulina, del número de células  $\beta$  (Parsons *et al.*, 1992) y del volumen de los islotes de Langerhans (Sorenson *et al.*, 1993). Se ha descrito un aumento de la expresión de los receptores de PRL (PRLR) durante la gestación y en islotes tratados con PRL *in Vitro* (Moldrup *et al.*, 1993; Vasavada *et al.*, 2006). Más aun, en ratones deficientes del PRLR se produce una disminución de la masa de las células  $\beta$  y de la secreción de insulina (Vasavada *et al.*, 2006).

Diversos estudios han indicado que la PRL en medios de cultivo de islotes de Langerhans produce un aumento significativo de la secreción de insulina y del número de células  $\beta$ , alcanzándose el máximo efecto a una concentración de



500 ng/ml y durante el séptimo día de tratamiento. Esto corresponde a un incremento de 2 veces en la secreción de insulina estimulada por glucosa y cerca de 4 veces en el número de células  $\beta$  (Parsons *et al.*, 1992; Brelje *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 1999; Haro-Hernández y Méndez, 2002). Incluso se ha descrito un aumento significativo en la secreción de insulina en islotes de mujeres adultas con muerte cerebral, cultivados por 8 días con 1  $\mu$ g/ml de PRL humana (Brelje *et al.*, 1993).

Finalmente, estudios realizados en ratones diabéticos no obesos inyectados con 1mg/kg/día de PRL, demostraron que este tratamiento fue capaz de impedir el desarrollo de DM en estos animales (Atwater *et al.*, 2002).

#### **5. Efecto de la prolactina ovina (PRL<sub>O</sub>) sobre los islotes de Langerhans.**

Se ha observado que la adición de PRL<sub>O</sub> a un cultivo de islotes de rata incrementa la proliferación de las células  $\beta$  aumentándola aproximadamente en 2,5 veces (Johansson *et al.*, 2006). También se ha reportado que al incubar cultivos de islotes de ratas recién nacidas con 2  $\mu$ g/ml de PRL<sub>O</sub>, el área de los islotes aumenta 2 veces y la secreción de insulina aumenta 2,4 veces (Sorenson *et al.*, 1987). Esto se debería a que la PRL de rata y la de oveja tienen una bioactividad y una afinidad similar por el PRLR de la rata (Lerant *et al.*, 2001). En ratas inyectadas por vía subcutánea con una dosis de 75  $\mu$ g de PRL<sub>O</sub> se observó en el suero un incremento de esta hormona, llegando a un *peak* de 300 ng/ml a los 90 min después de inyectada, nivel que disminuye gradualmente después de 3 h de inyectada (Lerant *et al.*, 2001).

## **OBJETIVOS.**

### **1. Objetivo general.**

Determinar el efecto de las inyecciones periódicas con dosis altas de prolactina ovina (PRLo) aplicadas en ratas sobre el contenido de insulina del páncreas y sobre el tamaño y número de los islotes de Langerhans.

### **2. Objetivos específicos.**

- Medir el contenido de insulina pancreática en ratas hembras y machos, tratadas con dosis altas de PRLo por periodos de 1 y 2 sem.
- Cuantificar el número y tamaño de los islotes de Langerhans en ratas hembras y machos, tratadas con dosis altas de PRLo por periodos de 1 y 2 sem.
- Cuantificar el número y tamaño de los islotes de Langerhans localizados en las regiones de la cola y cabeza de los páncreas de ratas tratadas con dosis altas de PRLo.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

### 1. Lugar y período del estudio.

Este estudio fue realizado entre los meses de mayo del 2005 y abril del 2007 en el Laboratorio de Neuroendocrinología y Cirugía Experimental del Programa de Genética Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### 2. Animales y alojamiento.

Se utilizaron 24 ratas *Sprague-Dawley* de 250-300 g de peso (12 machos y 12 hembras). Las ratas fueron alojadas en jaulas individuales de 30 cm de largo por 17 cm de ancho bajo un régimen de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Todos los individuos fueron alojados bajo las mismas condiciones de ambiente y alimentación en el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### 3. Tratamiento con PRL<sub>o</sub>.

Las ratas fueron inyectadas por vía subcutánea con 150 µg de PRL<sub>o</sub> (Sigma®, L-6520) disuelta en 200 µl de suero fisiológico. Las inyecciones se realizaron dos veces al día, a las 11:00 y a las 14:00 h. El control de peso se realizó diariamente previo a la inyección matinal.

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- **Grupo 1:** 3 ratas macho y 3 hembras inyectadas con PRL<sub>o</sub> por 7 días y sacrificadas el día 8.
- **Grupo 2:** 3 ratas macho y 3 hembras inyectadas con PRL<sub>o</sub> por 14 días y sacrificadas el día 15.

- **Grupo control 1:** 3 ratas macho y 3 hembras inyectadas con 200 µl de suero fisiológico por 7 días y sacrificadas el día 8.
- **Grupo control 2:** 3 ratas macho y 3 hembras inyectadas 200 µl de suero fisiológico por 14 días y sacrificadas el día 15.

#### **4. Sacrificio de las ratas.**

Todas las ratas fueron anestesiadas por vía intraperitoneal con 50 a 70 mg/kg de tiopental sódico. Luego de extraerles el páncreas todas fueron sacrificadas con una sobredosis de tiopental sódico al 2,5 % (dosis efecto), inyectada por vía intracárdica. El método de sacrificio fue aprobado por el “comité de bioética sobre investigación en animales” de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (protocolo CBA # 0124).

#### **5. División y procesamiento de los páncreas extraídos.**

Con el objetivo de obtener el contenido de insulina y las mediciones morfométricas en los páncreas de las mismas ratas, cada páncreas fue dividido en tres partes iguales: 1) La cabeza (la región más cercana al duodeno), 2) La cola (la región más cercana al bazo), y 3) La parte intermedia (entre la cola y cabeza). Inmediatamente después de extraer quirúrgicamente los páncreas, estos fueron pesados en una balanza de precisión (Mettler AE 163) y divididos en las partes anteriormente descritas, las cuales también fueron pesadas.

## **6. Obtención del contenido de insulina del páncreas.**

Con el fin de medir el contenido de insulina del páncreas de las ratas tratadas con PRL0 y sus controles, la parte intermedia del páncreas fue pesada y sumergida en 1 ml de solución de extracción de insulina (0,15 M HCl en alcohol etílico al 70 %), por una semana a 4°C. Luego se extrajo una alícuota que fue diluida 1:200 en una solución de tampón fosfato salino (PBS) (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma®, # D-5773) con albúmina bovina al 1 % (BSA 1 %) (Sigma®, # A-2153) a partir de la cual se realizó una prueba de ELISA directa tipo sandwich (Mercodia Rat Insulin ELISA, Alpco®, # 10-1124-10). Posteriormente, a partir de los resultados obtenidos en esta prueba se calculó el "contenido de insulina por gramo de páncreas" (CIPgr), medido en pg de insulina por g de páncreas. El CIPgr se multiplicó por el peso total del páncreas para así obtener el "contenido de insulina en el total del páncreas" (CIPT), medido en pg de insulina por el peso total del páncreas en g.

## **7. Medición del tamaño y número de los islotes de Langerhans.**

### **7.1. Inclusión de trozos de páncreas en parafina.**

Trozos de la cabeza y la cola del páncreas fueron fijados con paraformaldehído al 4 % por 24 h. Posteriormente fueron sumergidos en PBS por 1 h. Para deshidratar los tejidos, éstos fueron sumergidos en una batería de alcoholes de grados ascendentes (80 %, 96 % y 100 %) y permanecieron 30 min en cada alcohol. A continuación, los tejidos fueron sumergidos en xilol tres veces y permanecieron 10 a 15 min por vez. Luego fueron incluidos en parafina al 56 % y 60 % por 30 a 40 min en cada una a 60°C. Un corte de 5 µm se obtuvo de la

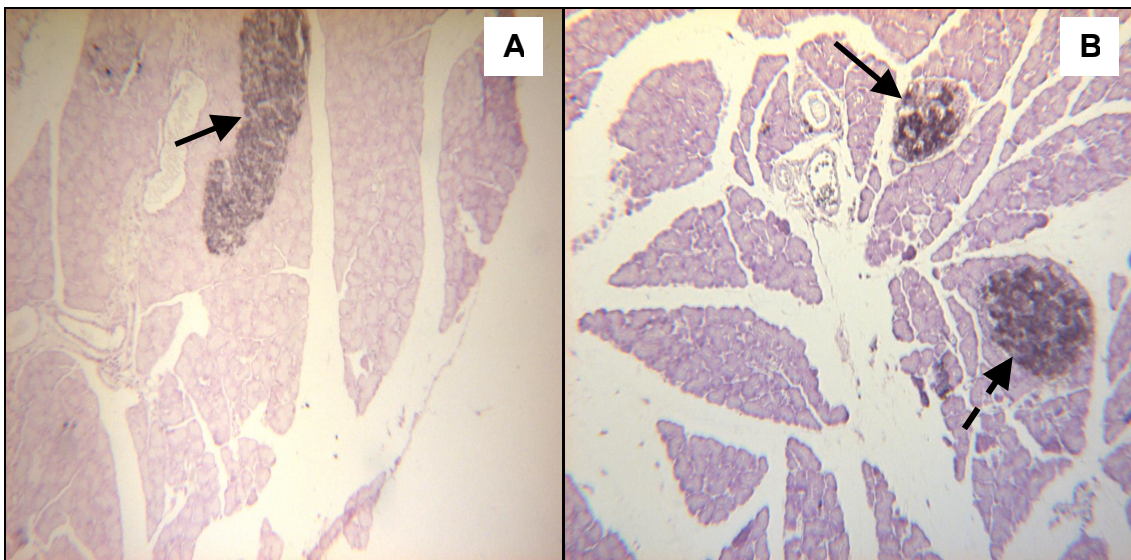
región de la cabeza y otro de la cola para luego montarlos en portaobjetos, para ello, estos fueron estirados en un baño térmico a 50°C. Los cortes fueron adheridos a los portaobjetos con albúmina al 1 % y luego se dejaron secar por 12 h a 40°C.

## **7.2. Inmunohistoquímica.**

Para inmunomarcarse los islotes de Langerhans se utilizó un anticuerpo anti-insulina producido en suero de cobayo (Dako®, # A-0564, USA) y un anticuerpo secundario anti-cobayo conjugado con peroxidasa (Sigma®, # A-5545). El revelado se realizó mediante un *Kit* de sustrato de diaminobenzidina para peroxidasa (DAB) (Vector®, # SK-4100) y fue contrateñido con hematoxilina. Los pasos del protocolo son descritos en el Anexo 1.

### 7.3. Microfotografías de los cortes de páncreas.

Con el fin de cuantificar en número y tamaño los islotes de Langerhans marcados con el método de inmunohistoquímica, se procedió a fotografiar cada uno de los cortes histológicos de la cabeza y cola. Para esto utilizamos un microscopio con campo claro (Nikon®) equipado con una cámara digital (Coolsnapcf®), utilizando un aumento total de 9,5X. De cada corte se obtuvo alrededor de 30 a 60 fotografías. Más de 2000 fotografías fueron analizadas con el programa computacional Photoshop 7.0 (Adobe ®) (Fig. 1).



**Figura 1. Islotes de Langerhans inmunomarcados con el método de Inmunohistoquímica.** (A) La flecha sólida indica a un islote de Langerhans de tamaño grande ( $\sim 280 \mu^2$ ). (B) La flecha sólida indica a un islote de Langerhans de tamaño pequeño ( $\sim 30 \mu^2$ ) y la flecha punteada indica a un islote de tamaño mediano ( $\sim 115 \mu^2$ ).

#### **7.4. Medición del tamaño de los islotes de Langerhans.**

Para poder comparar entre cortes histológicos de distinto tamaño, los valores del tamaño de los islotes de Langerhans se expresaron como el porcentaje de área ocupada por islotes (PAOI) del área total de páncreas en la placa.

$$\text{PAOI} = \frac{\text{Área de islotes en la placa}}{\text{Área del páncreas en la placa}} \times 100$$

El área del páncreas que fue teñida con hematoxilina y las áreas inmunomarcadas de cada islote fueron medidas en píxeles y transformadas a micrómetros cuadrados ( $\mu^2$ ), siendo un píxel equivalente a  $0,0049 \mu^2$

#### **7.5. Cuantificación del número de islotes de Langerhans.**

Ya que el número de islotes de Langerhans contados en cada placa es un valor que no se puede comparar entre los distintos tamaños de cortes histológicos, los valores se expresaron como densidad de islotes. Para esto se aplicó la siguiente razón:

$$\text{Densidad de islotes} = \frac{\text{Número de islotes en la placa}}{\text{Área del páncreas en la placa}}$$



## 8. Análisis de la distribución según el tamaño de los islotes de Langerhans.

Para evaluar la distribución de los distintos tamaños de islotes de Langerhans en los páncreas de las ratas tratadas con PRL0 y sus respectivos controles se construyeron histogramas, dividiendo los islotes según su tamaño en grupos (A, B, C, D, E, F y G) y en categorías:

- Pequeños: A =  $\leq 50 \mu^2$ .
- Medianos: B = 51-100  $\mu^2$ ; C = 101-150  $\mu^2$ ; D = 151-200  $\mu^2$ .
- Grandes: E = 201-250  $\mu^2$ ; F = 251-300  $\mu^2$ ; G = 301-350  $\mu^2$ .

Los histogramas fueron construidos con el programa Origin 6.1 (OriginLab Corporation®).

## 9. Análisis Estadístico.

Para el análisis de los resultados se utilizó un **modelo de regresión lineal múltiple** (*Stepwise*) que tiene como objetivo medir la significancia de las variables predictoras o independientes (tratamiento con PRL0, sexo, duración del tratamiento) sobre las variables de respuesta o dependientes (densidad de islotes, PAOI, contenido de insulina). El modelo **Stepwise** consiste en aplicar un modelo de regresión múltiple sobre todas las variables posibles a estudiar en un principio para posteriormente ir descartando las que no presenten efectos significativos. Este modelo es muy útil en investigaciones exploratorias en las que poco se sabe acerca de muchos factores.

Este modelo inicial consistió en:

$$Y = \alpha + \beta I + \gamma S + \delta T$$

Donde:

- $\beta I$  representa a la variable tratamiento (con PRL o con suero fisiológico) y su respectivo coeficiente de regresión  $\beta$ .
- $\gamma S$  representa a la variable sexo y su respectivo coeficiente de regresión  $\gamma$ .
- $\delta T$  representa a la variable duración del tratamiento (1 ó 2 semanas) y su respectivo coeficiente de regresión  $\delta$ .
- $\alpha$  es la intersección de la línea de regresión.
- $Y$  es el valor predicho (CIPT, CIPgr, PAOI y Densidad de islotes).

Para este modelo se utilizó el análisis de varianza multivariada (ANDEVAM) y para obtener los resultados el programa computacional SPSS 13.0®. El valor considerado como significativo fue de  $p < 0.05$ .

Para saber si hay o no un efecto significativo de las variables sexo y duración del tratamiento sobre las ratas tratadas con PRL0 y sus controles por separado, se aplicó el modelo de regresión lineal múltiple (*Stepwise*) sólo sobre las ratas tratadas con PRL0 y otra regresión sólo sobre las ratas controles. De tal modo que el modelo inicial fue aplicado de la siguiente forma:

$$Y = \alpha + \gamma S + \delta T$$

Donde:

- $\gamma S$  representa la variable sexo y su respectivo coeficiente de regresión  $\gamma$ .
- $\delta T$  representa la variable duración del tratamiento (1 ó 2 semanas) y su respectivo coeficiente de regresión  $\delta$ .
- $\alpha$  es la intersección de la línea de regresión.
- $Y$  es el valor predicho (CIPT, CIPgr, PAOI y Densidad de islotes).

#### **10. Reactivos.**

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico y obtenidos en Sigma-Aldrich Chemical Co.

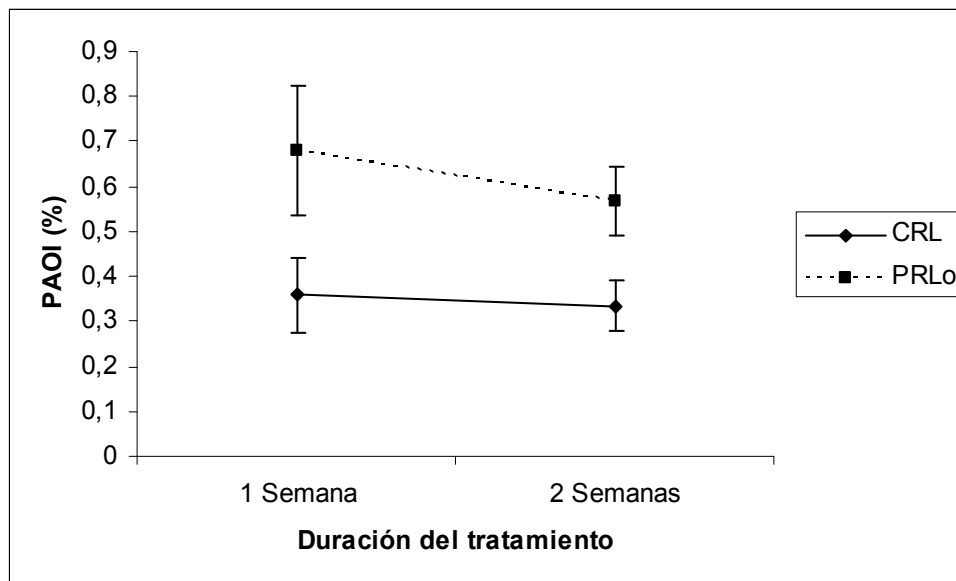
## RESULTADOS.

### 1. Efecto del tratamiento con PRLo sobre el PAOI y sobre la densidad de islotes.

La inyección de PRLo indujo un efecto significativo sobre el PAOI ( $p=0,005^{**}$ ), el cual aumentó 1,8 veces en las ratas tratadas con PRLo por sobre los controles (Tabla 1). El sexo y la duración del tratamiento con PRLo no tienen un efecto significativo sobre el PAOI (Tablas 2 y 3). Se observó que en la primera semana de tratamiento hay una diferencia en promedio del PAOI de 1.9 veces en las ratas tratadas con PRLo en comparación a sus controles. Esta diferencia presentó una leve tendencia a disminuir, siendo en promedio de 1,7 veces en la segunda semana de tratamiento (Fig. 2, Tabla 2). El tratamiento con PRLo, el sexo y la duración del tratamiento no evidenciaron efectos significativos sobre la densidad de los islotes (Tablas 1, 2 y 3).

	Controles	Tratados con PRLo
PAOI (%)	0,347 $\pm$ 0,046	0,624 $\pm$ 0,046 **
Densidad de Islotes	1,45 x 10 <sup>-6</sup> $\pm$ 0,09 x 10 <sup>-6</sup>	1,5 x 10 <sup>-6</sup> $\pm$ 0,14 x 10 <sup>-6</sup>

**Tabla 1. Comparación del PAOI y de la densidad de Islotes en las ratas controles y las tratadas con PRLo.** Los datos mostrados en la tabla corresponden al promedio de n=12 ratas controles y n=12 ratas tratadas con PRLo. \*\* =  $p < 0.01$  versus el control (Regresión Lineal Múltiple *Stepwise*). Los datos representados corresponden al promedio  $\pm$  error estándar.



**Figura 2. Porcentaje del área ocupada por islotes (PAOI) en los páncreas de ratas controles (CRL) y tratadas con prolactina ovina (PRL0) a la semana 1 y 2 de tratamiento.** Los datos mostrados corresponden al promedio de 6 ratas controles y 6 tratadas con PRL0 por 1 semana y 6 ratas controles y 6 tratadas con PRL0 por 2 semanas. Los datos representados corresponden al promedio  $\pm$  error estándar.

	1 Semana	2 Semanas
PAOI (%) en Controles	0,36 $\pm$ 0,084	0,34 $\pm$ 0,06
PAOI (%) en Tratados con PRL0	0,68 $\pm$ 0,15	0,57 $\pm$ 0,08
Densidad de Islotes en Controles	1,61 $\times 10^{-6}$ $\pm$ 0,2 $\times 10^{-6}$	1,3 $\times 10^{-6}$ $\pm$ 0,154 $\times 10^{-6}$
Densidad de Islotes en Tratados con PRL0	1,54 $\times 10^{-6}$ $\pm$ 0,17 $\times 10^{-6}$	1,45 $\times 10^{-6}$ $\pm$ 0,15 $\times 10^{-6}$

**Tabla 2. Comparación del PAOI y de la densidad de Islotes según la duración del tratamiento.** Los promedios mostrados en la tabla no muestran una diferencia significativa. n=12 ratas inyectadas por 1 semana (6 controles más 6 tratadas con PRL0) y 12 inyectadas por 2 semanas (6 controles más 6 tratadas con PRL0). Los datos representados corresponden al promedio  $\pm$  error estándar.

	Machos	Hembras
PAOI (%) en Controles	0,39 ± 0,079	0,304 ± 0,06
PAOI (%) en Tratados con PRL0	0,596 ± 0,064	0,652 ± 0,152
Densidad de Islotes en Controles	1,46 x 10 <sup>-6</sup> ± 0,17 x 10 <sup>-6</sup>	1,45 x 10 <sup>-6</sup> ± 0,2 x 10 <sup>-6</sup>
Densidad de Islotes en Tratados con PRL0	1,54 x 10 <sup>-6</sup> ± 0,16 x 10 <sup>-6</sup>	1,45 x 10 <sup>-6</sup> ± 0,16 x 10 <sup>-6</sup>

**Tabla 3. Comparación del PAOI y de la densidad de Islotes según sexo.** Los promedios mostrados en la tabla no muestran una diferencia significativa. n=12 ratas machos (6 controles más 6 tratados con PRL0) y 12 hembras (6 controles más 6 tratados con PRL0). Los datos representados corresponden al promedio ± error estándar.

El PAOI promedio en las ratas controles no mostró una diferencia significativa entre las regiones de la cola (0,38%) y de de la cabeza del páncreas (0,32%) (Tablas 4 y 5). Por el contrario, el tratamiento con PRLo indujo un aumento significativo de 2,2 veces del PAOI en la región de la cabeza ( $p=0,018^*$ ) (Tabla 4), sin tener un efecto significativo en la región de la cola (Tabla 5), este fenómeno resultó ser independiente del sexo y de la duración del tratamiento (datos no mostrados). En la cabeza y en la cola no se observó un efecto significativo de las inyecciones de PRLo (Tablas 4 y 5), del sexo y de la duración del tratamiento (datos no mostrados) sobre la densidad de los islotes de Langerhans.

<b>CABEZA</b>	Controles	Tratados con PRLo
PAOI (%)	0,32 ± 0,047	0,79 ± 0,069*
Densidad de Islotes	$1,39 \times 10^{-6} \pm 0,18 \times 10^{-6}$	$1,66 \times 10^{-6} \pm 0,12 \times 10^{-6}$

**Tabla 4. Comparación del PAOI y de la densidad de Islotes en la región de la cabeza en las ratas controles y tratadas con PRLo.** El PAOI de animales inyectados con PRLo ( $n=12$ ) mostró una diferencia significativa con respecto a los controles ( $n=12$ ). \* =  $p < 0.05$  versus control (Regresión lineal Múltiple *Stepwise*). Los datos representados corresponden al promedio ± error estándar.

<b>COLA</b>	Controles	Tratados con PRLo
PAOI (%)	0,38 ± 0,085	0,54 ± 0,018
Densidad de Islotes	$1,52 \times 10^{-6} \pm 0,06 \times 10^{-6}$	$1,33 \times 10^{-6} \pm 0,23 \times 10^{-6}$

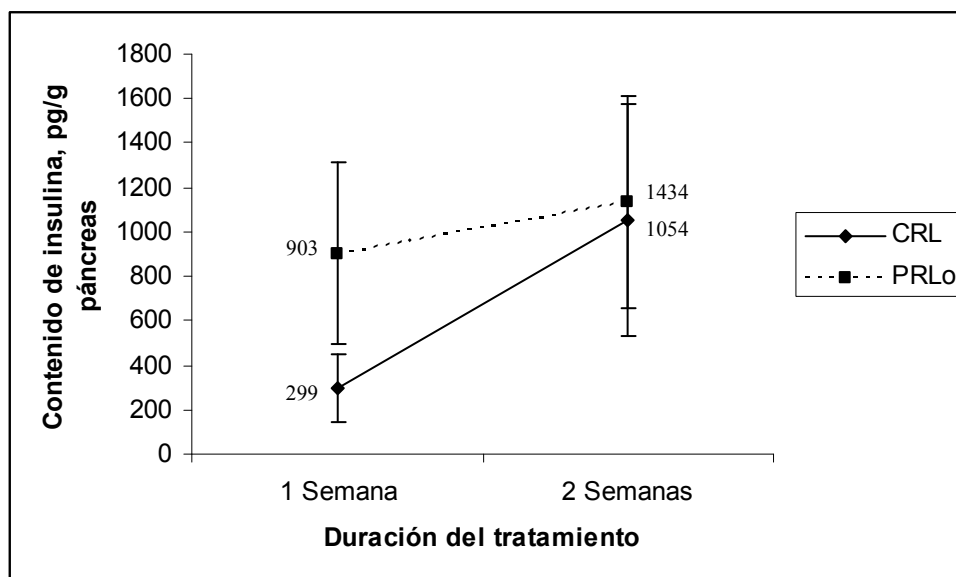
**Tabla 5. Comparación del PAOI y de la densidad de Islotes en la región de la cola en las ratas controles y tratadas con PRLo.** El PAOI y la densidad de islotes de animales inyectados con PRLo no mostraron una diferencia significativa con respecto a los controles ( $n=12$  controles y 12 tratados con PRLo). Los datos representados corresponden al promedio ± error estándar.

## 2. Medición del Contenido de Insulina.

Se procedió a medir la producción de insulina de la parte intermedia del páncreas y se expresó como el CIPgr y CIPT.

### 2.1. Medición del CIPgr.

En la primera semana de tratamiento se observó un aumento en promedio del CIPgr en los animales tratados con PRL<sub>o</sub> en comparación a sus controles ( $903 \pm 408$  y  $299 \pm 155$ , respectivamente) (Fig. 3). Esta diferencia disminuyó en la segunda semana de tratamiento ( $1134 \pm 479$  los tratados y  $1054 \pm 524$  los controles). Sin embargo, ninguna de estas diferencias fue significativa estadísticamente.



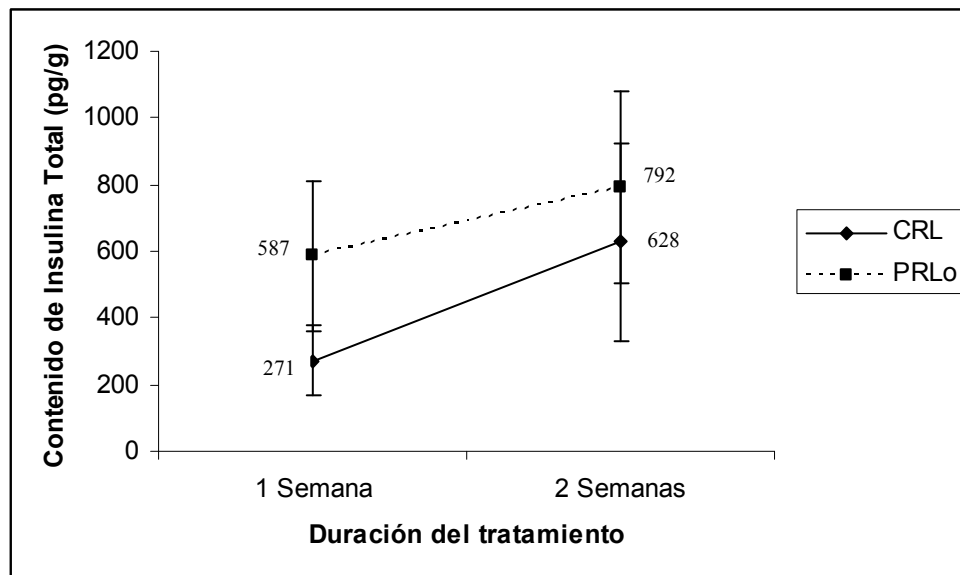
**Figura 3. Contenido de insulina por gramo de páncreas (CIPgr) medido con la prueba de ELISA en ratas inyectadas con prolactina ovina (PRL<sub>o</sub>) y ratas inyectadas con suero fisiológico (CRL) por 1 y 2 semanas.** Los datos mostrados corresponden al promedio de 5 ratas controles y 5 ratas tratadas con PRL<sub>o</sub> por 1 semana y 4 ratas controles y 6 ratas tratadas con PRL<sub>o</sub> por 2 semanas. Los datos representados corresponden al promedio  $\pm$  error estándar.



Además, al aplicar el modelo de regresión lineal múltiple no se encontró diferencias significativas del CIPgr entre machos y hembras tratadas con PRLo ni un cambio significativo al aumentar la duración del tratamiento con PRLo de una a dos semanas.

## 2.2. Medición del CIPT.

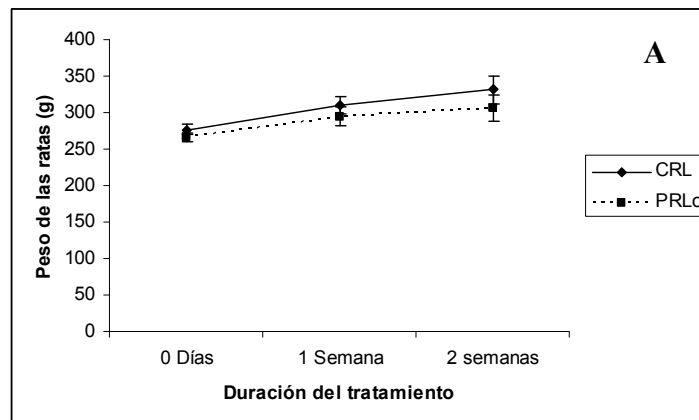
En la primera semana de tratamiento se observó un aumento en promedio del CIPT en los animales tratados con PRLo en comparación a sus controles ( $587 \pm 226$  y  $271 \pm 105$ , respectivamente). En la segunda semana de tratamiento se observó un mayor CIPT en los animales tratados con PRLo que sus controles ( $792 \pm 287$  y  $628 \pm 297$  respectivamente), aunque esta diferencia disminuyó con respecto a la primera semana. Sin embargo, ninguna de estas diferencias tuvo significancia estadística (Fig. 4).



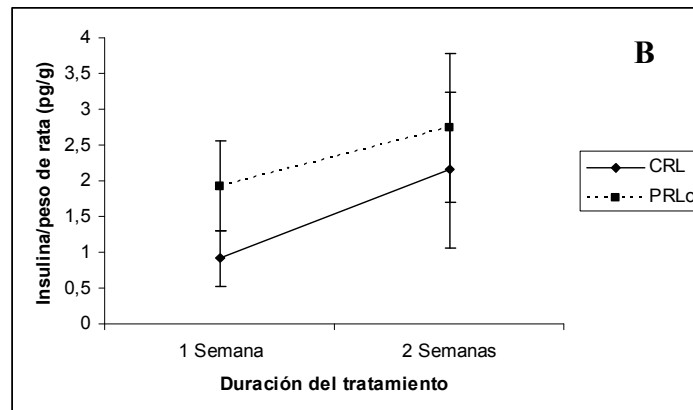
**Figura 4. Contenido de insulina en el total del páncreas (CIPT) medido con la prueba de ELISA en ratas inyectadas con prolactina ovina (PRLo) y ratas inyectadas con suero fisiológico (CRL) por 1 y 2 semanas.** Los datos mostrados corresponden al promedio de 5 ratas controles y 5 ratas tratadas con PRLo por 1 semana y 4 ratas controles y 6 ratas tratadas con PRLo por 2 semanas. Los datos representados corresponden al promedio  $\pm$  error estándar.

Al aplicar el modelo de regresión lineal múltiple no se encontró diferencias significativas del CIPT entre machos y hembras tratadas con PRLo, ni un cambio significativo al aumentar la duración del tratamiento con PRLo de una a dos semanas.

Al relacionar el CIPT con el peso de la rata (g) se observó que a pesar que las ratas tratadas con PRL<sub>o</sub> tienen casi el mismo peso sus controles (Fig. 5A), las ratas tratadas con PRL<sub>o</sub> presentaron un mayor contenido de insulina que sus controles (Fig. 5B).



**Figura 5A. Peso de las ratas tratadas con prolactina ovina (PRL<sub>o</sub>) y sus controles (CRL) a los 0 días, 1 semana y 2 semanas de tratamiento.** En esta figura se observa que no hay una diferencia de peso entre las ratas tratadas con PRL<sub>o</sub> y sus controles. Tanto las ratas tratadas con PRL<sub>o</sub> como sus CRL tienen un n=12 a los 0 días y a la semana de tratamiento, y a las 2 semanas tienen un n=6, ya que 6 ratas fueron sacrificadas después de cumplir una semana de tratamiento.



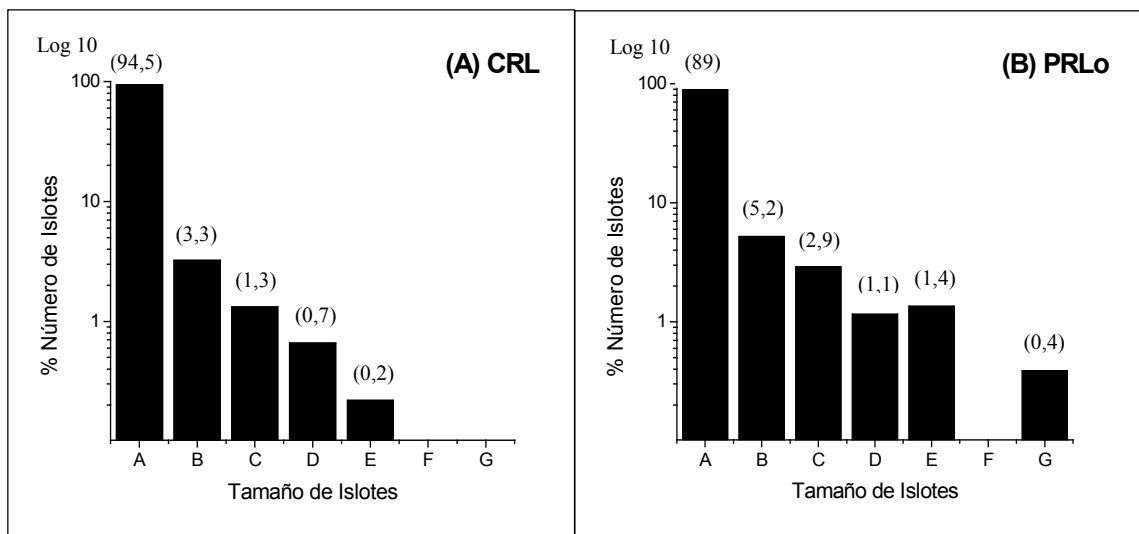
**Figura 5B. Contenido de insulina total (CIPT) (pg) por peso de rata (g).** En esta figura se observa que el contenido de insulina de las ratas tratadas con PRL<sub>o</sub> (n=6) siempre es mayor al de sus controles (CRL) (n=6).

### 3. Distribución de los islotes de Langerhans según su tamaño.

Para observar la distribución de los islotes de Langerhans en los cortes histológicos de los páncreas de rata se construyeron los siguientes histogramas (Figuras 6, 7, 8, y 9).

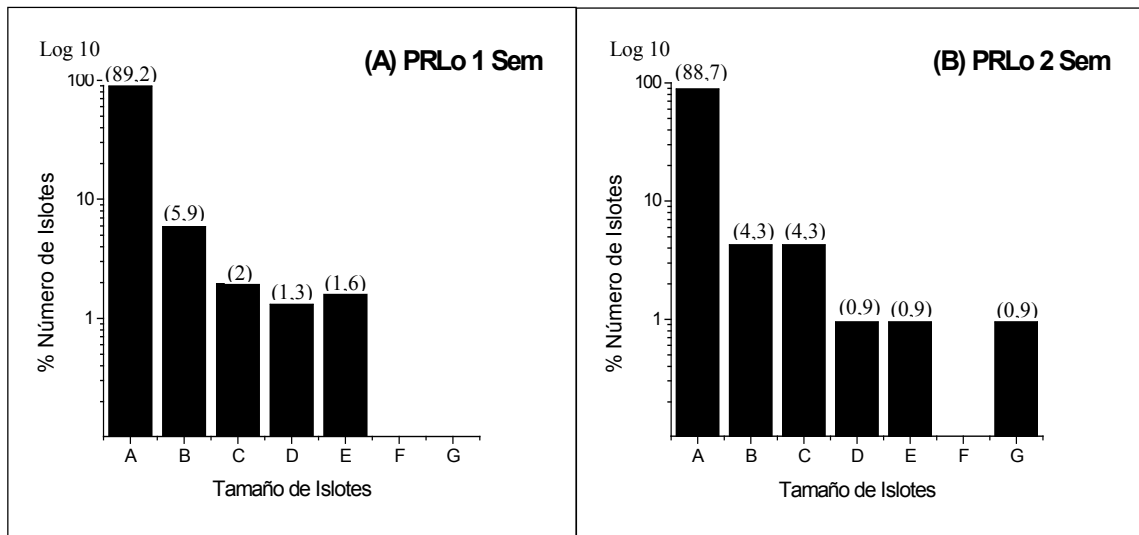
#### 3.1. Distribución de los islotes de Langerhans en la región de la cabeza.

Al comparar un total de 454 islotes, contados en la cabeza del páncreas de las ratas controles, con 516 islotes contados en la cabeza del páncreas de las ratas tratadas con 150  $\mu\text{g}$  PRL0, en estas últimas el porcentaje de islotes medianos aumentó un 3,9% y el porcentaje de islotes grandes aumento un 1,6%. Además, se observó una disminución de un 5,5% del porcentaje de islotes pequeños (Fig. 6A y 6B).



**Figura 6. Histograma de los distintos tamaños de islotes (de  $\leq 50$  a  $350 \mu^2$ ) de la región de la cabeza del páncreas expresando el número de ellos como porcentaje. (A) Islotes contados en los páncreas de todas las ratas controles (n=12). (B) Islotes contados en los páncreas de todas las ratas inyectadas con PRL0 (n=12). Sobre cada barra se indica el porcentaje de islotes contados correspondiente a cada tamaño. En este histograma el “eje y” fue graficado en una escala de log 10 para así poder observar las categorías con menor porcentaje.**

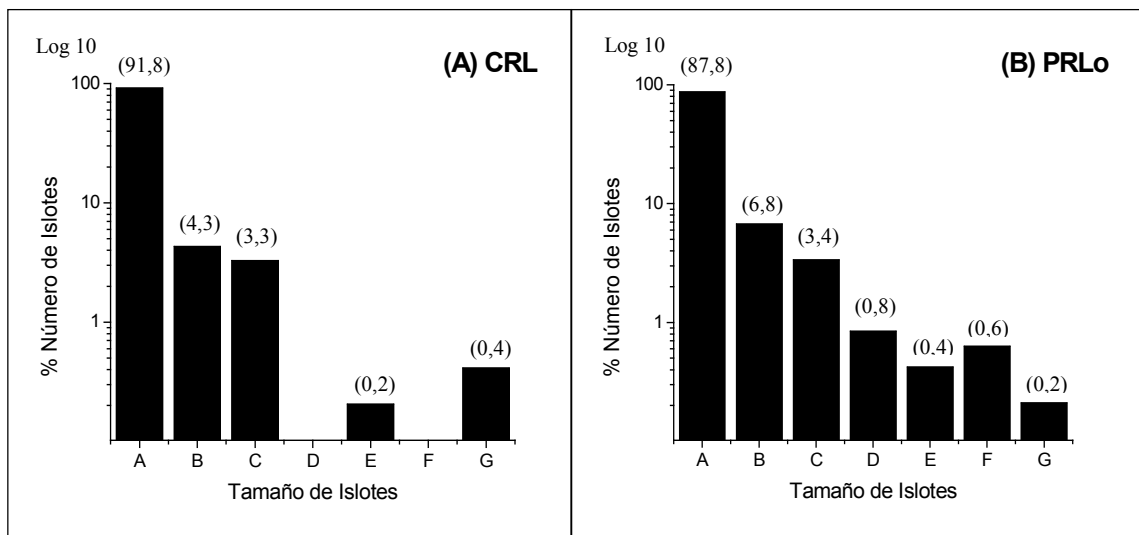
Al comparar un total de 305 islotes, contados en la cabeza del páncreas de ratas tratadas con PRL0 por 1 semana, con 201 islotes contados en la cabeza del páncreas de ratas tratadas con PRL0 por 2 semanas, se observó que a las 2 semanas de tratamiento con PRL0, el porcentaje de islotes grandes aumentó un 0,2%, el porcentaje de islotes medianos aumentó un 0,3%, y el porcentaje de islotes pequeños disminuyó un 0,5% (Fig. 7A y 7B).



**Figura 7. Histograma de los distintos tamaños de islotes (de  $\leq 50$  a  $350 \mu^2$ ) de la región de la cabeza del páncreas expresando el número de ellos como porcentaje. (A) Islotes contados en los páncreas de las ratas (n=6) inyectadas con PRL0 por 1 semana. (B) Islotes contados en los páncreas de las ratas (n=6) inyectadas con PRL0 por 2 semanas. Sobre cada barra se indica el porcentaje de islotes contados correspondiente a cada tamaño. En estos histogramas el “eje y” fue graficado en una escala de log<sub>10</sub> para así poder observar las categorías con menor porcentaje.**

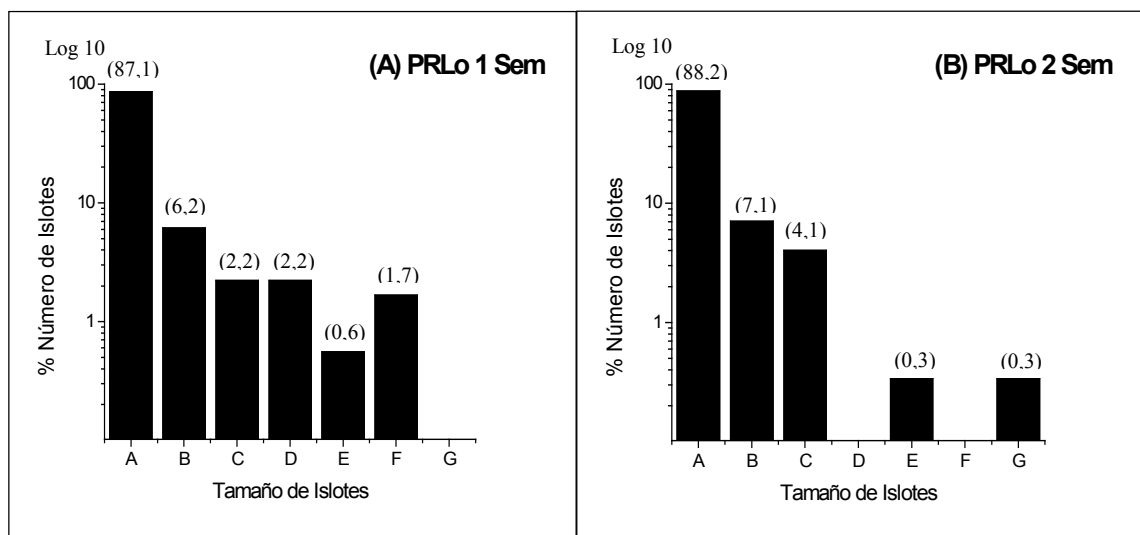
### 3.2. Distribución de los islotes de Langerhans en la región de la cola.

Al contar un total de 486 islotes en la cola del páncreas de las ratas controles y compararlos con 475 islotes contados en la cola del páncreas de las ratas tratadas con 150  $\mu\text{g}$  PRL0. En las ratas tratadas con PRL0 se observó que el porcentaje de islotes medianos aumentó un 3,4% y el porcentaje de islotes grandes aumentó un 0,6%. Se observó que el porcentaje de islotes pequeños disminuyó un 4% (Fig. 8A y 8B).



**Figura 8. Histograma de los distintos tamaños de islotes (de  $\leq 50$  a  $350 \mu^2$ ) de la región de la cola del páncreas expresando el número de ellos como porcentaje. (A) Islotes contados en los páncreas de todas las ratas controles ( $n=12$ ) inyectadas con  $200 \mu\text{l}$  de suero fisiológico. (B) Islotes contados en los páncreas de todas las ratas inyectadas con PRL0 ( $n=12$ ). Sobre cada barra se indica el porcentaje de islotes contados correspondiente a cada tamaño. En este histograma el “eje y” fue graficado en una escala de log 10 para así poder observar las categorías con menor porcentaje.**

Al comparar un total de 179 islotes, contados en la cola del páncreas de ratas tratadas con PRLo por 1 semana, con los 296 islotes contados en la cola del páncreas de ratas tratadas con PRLo por 2 semanas, se observó que a la segunda semana de tratamiento con PRLo el porcentaje de islotes grandes disminuyó un 1,7%, el porcentaje de islotes medianos aumentó un 0,6%, y el porcentaje de islotes pequeños aumentó un 1,1% (Fig. 9A y 9B).



**Figura 9. Histograma de los distintos tamaños de islotes (de  $\leq 50$  a  $350 \mu^2$ ) de la región de la cola del páncreas expresando el número de ellos como porcentaje. (A) Islotes contados en la región de la cola del páncreas de las ratas ( $n=6$ ) inyectadas con PRLo por 1 semana. (B) Islotes contados en la región de la cola del páncreas de las ratas ( $n=6$ ) inyectadas con PRLo por 2 semanas. Sobre cada barra se indica el porcentaje de islotes contados correspondiente a cada tamaño. En este histograma el fue graficado en una escala de log 10 para así poder observar las categorías con menor porcentaje.**

## DISCUSIÓN.

### 1. Efecto del tratamiento con PRL<sub>o</sub> sobre el tamaño y la densidad de los islotes de Langerhans.

En el presente trabajo se ha investigado el efecto de la administración de la hormona PRL sobre el tamaño, densidad y contenido de insulina de los islotes de Langerhans en ratas *in vivo*. Los resultados obtenidos de este trabajo indican que la administración de PRL<sub>o</sub> indujo un efecto significativo sobre el PAOI, el cual aumento 1,8 veces en promedio en las ratas inyectadas con PRL<sub>o</sub> por sobre los controles. Esto coincide con el aumento de volumen de los islotes observados en la gestación descritos por Sorenson *et al.*, 1993 y en experimentos realizados en cultivos de islotes por Parsons *et al.*, 1992 y Sorenson *et al.*, 1987. Esto indica que el tratamiento con 150 µg de PRL<sub>o</sub> logró una concentración plasmática suficiente para estimular los PRLR ubicados en las células β, induciendo probablemente una hipertrofia y una hiperplasia de éstas, aunque estos cambios específicos no fueron cuantificados en este trabajo.

Se ha reportado, que la cantidad de islotes obtenidos del páncreas de donantes es significativamente mayor en la región de la cola, en comparación a la región de la cabeza y actualmente se encuentra en evaluación la posibilidad de que el transplante de islotes desde donantes vivos, puede ser factible usando sólo esta región (Matsumoto *et al.*, 2004; Hughes *et al.*, 2005; Srinivasan *et al.*, 2007). Por primera vez, se ha estudiado los efectos de la PRL en las regiones de la cabeza y cola por separado. Los resultados de este estudio indican que la PRL<sub>o</sub> sólo produjo un efecto significativo sobre el tamaño de los islotes en la



región de la cabeza del páncreas, aumentando su PAOI en promedio 2,2 veces. Sin embargo, no se produjo un efecto significativo con las inyecciones de PRL<sub>o</sub> en los islotes de la cola, aunque en esta región se observó un aumento del PAOI en promedio de un 40%. La menor respuesta al tratamiento con PRL<sub>o</sub> observada en los islotes de la cola podría explicar porque sólo el 10% de los pacientes receptores de un trasplante de islotes permanecen con insulino independencia después de 5 años de realizado el trasplante de islotes (Ryan *et al.*, 2005; Srinivasan *et al.*, 2007). Esto ocurre porque la PRL, que podría estar involucrada permanentemente en la regeneración de las células  $\beta$ , dado nuestros resultados, no induciría dicho efecto en forma eficiente en los islotes transplantados, ya que éstos son obtenidos mayormente de la cola. Por esto, las diferencias observadas entre cabeza y cola necesitan ser investigadas de una forma más específica, midiendo si hay una diferencia de la producción y secreción de insulina entre los islotes de la cola y cabeza en respuesta al tratamiento con PRL.

## **2. Efecto del tratamiento de PRL<sub>o</sub> sobre el contenido de insulina.**

Los resultados en este estudio indican que el contenido de insulina de las ratas tratadas con PRL<sub>o</sub> es mayor al de sus controles a pesar que las ratas de ambos grupos tienen el mismo peso. Además, se observó que en la primera semana de tratamiento con PRL<sub>o</sub>, este aumento obtuvo similares dimensiones a las descritas *in vitro* (Sorenson *et al.*, 1987; Brelje *et al.*, 1993) y guarda una estrecha relación con el aumento de tamaño observado en los islotes de los mismos páncreas. Esto sugiere, que el tratamiento con PRL<sub>o</sub> si puede producir

*in vivo* los mismos efectos descritos *in vitro*. Sin embargo, el aumento del CIPgr y del CIPT no fue significativo al aplicar el modelo estadístico. Esto fue provocado, debido a que en las muestras se produjeron varianzas muy grandes, ya que algunas de éstas posiblemente fueron afectadas por las condiciones variables en que fueron almacenadas. En experimentos futuros se propone repetir la medición del contenido de insulina, midiéndolo en las regiones de la cola y de la cabeza por separado.

### **3. Efecto del tratamiento con PRLo según el sexo.**

Los resultados de este estudio indican que no hay una diferencia significativa del efecto producido por el tratamiento con PRLo sobre el contenido de insulina, PAOI y densidad de islotes entre machos y hembras. Estos resultados no son concluyentes acerca del posible efecto del sexo sobre el contenido de insulina, debido a problemas con el almacenamiento de las muestras. Sin embargo, los resultados del PAOI obtenidos surgieron que el sexo no sería una variable importante a considerar al tratar ratas con PRLo. Estudios indican que los machos y las hembras en condiciones normales no tienen una cantidad diferente de PRLR en sus células  $\beta$  (Moldrup *et al.*, 1993), esto nos indicaría que la estimulación de la PRLo sobre los PRLR es similar en ambos sexos y que el efectos de hormonas sexuales tales como: progesterona, estrógenos y testosterona no producirían una diferencia en el PAOI y en el contenido de insulina.

#### **4. Efecto de la duración del tratamiento con PRL0.**

Los resultados sugieren que, aunque el tratamiento con PRL0 es capaz de aumentar el PAOI y el contenido de insulina, este efecto no se incrementó al prolongar el tiempo de tratamiento. Esto puede ocurrir probablemente porque la producción de nuevos PRLR en las células  $\beta$  tendría un límite. Los PRLR existentes se depletarían con PRL y no permitirían que la magnitud del efecto de esta hormona obtenido en la primera semana, siga aumentando durante la segunda semana de tratamiento.

#### **5. Efecto del tratamiento de PRL0 sobre el número de islotes de Langerhans.**

En las ratas tratadas con PRL0 se produjo un incremento del tamaño de los islotes aunque éstos no aumentaron en número, este resultado es consistente con los datos que indican que la PRL induce un aumento de la actividad mitótica en las células  $\beta$  (Brelje *et al.*, 1993; Sorenson *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 1999; Haro-Hernández y Méndez, 2002). Sin embargo, en este experimento no se midió directamente la actividad proliferativa de las células  $\beta$ .

#### **6. Efecto del tratamiento de PRL0 sobre la distribución de los islotes de distinto tamaño.**

Los histogramas muestran que en la cabeza y en la cola de los páncreas de las ratas tratadas con PRL0 se produjo un aumento del porcentaje de islotes medianos y grandes (Fig 6 y 8), esto indica que los islotes aumentaron de tamaño. En la cabeza, el tratamiento con PRL0 indujo que los islotes medianos

aumentaran un 3,9% y que los islotes grandes aumentaran un 1,6 %, lo cual se correlaciona con el aumento del PAOI observado en esta región. Sin embargo, en la cola, se produce un aumento de los islotes medianos y grandes menor que en la cabeza, el cual sería la causa de porqué no se produjo un aumento significativo del PAOI en la cola. Además, al prolongar la duración del tratamiento con PRL, se produce un aumento de los islotes grandes (0,2%) en la cabeza y una disminución de éstos (1,7%) en la cola. Estos datos indican que los islotes ubicados en distintas las regiones del páncreas presentan características diferentes de respuesta a la PRL. Se sabe que en los mamíferos la cabeza y la cola del páncreas tienen distinto origen embrionario (Louw *et al.*, 1997), ésta podría ser la causa de estas diferencias. Estos resultados nos sugieren que se debería indagar sobre cuál es el efecto de la PRL sobre el contenido de insulina de los islotes en la región de la cabeza y de la cola por separado.

En su conjunto, nuestros resultados sugieren que el tratamiento con PRL produciría un efecto directo sobre los islotes de Langerhans similar al observado *in vitro* (Parsons *et al.*, 1992; Brelje *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 1999; Haro-Hernández y Méndez, 2002). Estos antecedentes posicionarían en un futuro a la PRL, como una posible alternativa terapéutica para pacientes con DM tipo 1 que han sido sometidos a un trasplante de islotes de Langerhans, para lograr que los islotes transplantados crezcan y sean más eficientes. Aun más importante, la PRL podría servir para tratar a pacientes con DM tipo 2, ya que en ellos podría aumentar la masa de islotes, la producción y secreción de insulina.

## CONCLUSIONES.

- EL tratamiento *in vivo* con PRLo induce un aumento significativo del tamaño de los islotes de Langerhans en ratas *Sprawley-Dawley*.
- El tratamiento con PRLo induce un aumento del tamaño de los islotes preferencialmente en la región de la cabeza del páncreas.
- El aumento del tamaño de los islotes de Langerhans y inducido por el tratamiento con PRLo tiene su máximo efecto durante la primera semana de tratamiento.
- El efecto del tratamiento con PRLo sobre el tamaño de los islotes es similar en machos y hembras.
- El tratamiento *in vivo* con PRLo no induce un aumento del número de islotes de Langerhans en las ratas *Sprague-Dawley*.

## BIBLIOGRAFÍA.

**ADAMEC, M.** 2003. Transplantation of the Pancreas. *Cas. Lek. Cesk.* 142(12): 727-732.

**ANDREWS, Z.B.; GRATTAN, D.R.** 2003. Opioid Receptor Subtypes Involved in the Regulation of Prolactin Secretion During Pregnancy and Lactation. *J Neuroendocrinol.* 15: 227-236.

**ANDREWS, Z.B.; KOKAY, I.C.; GRATTAN, D.R.** 2001. Dissociation of Prolactin Secretion from Tuberoinfundibular Dopamine Activity in Late Pregnant Rats. *Endocrinology* 142(6): 2719-2724.

**ATWATER, I.; GONDOS, B.; DIBARTOLOMEO, R.; BAZAES, R.; JOVANOVIĆ, L.** 2002. Pregnancy Hormones Prevent Diabetes and Reduce Lymphocytic Infiltration of Islets in the NOD Mouse. *Ann Clin Lab Sci.* 32(1): 87-92.

**BALIBREA DEL CASTILLO, J.M.; VARA, E.; ARIAS, J.; GARCÍA, M.C.; GARCÍA, J.C.; BALIBREA CANTERO, J.L.** 2007. Estado Actual del Transplante de Islotes Pancreáticos. *Cir. Esp.* 81(4): 177-191.

**BEN-JONATHAN, N.; MERSHON, J.L.; ALLEN, D.L.; STEINMETZ, R.W.** 1996. Extrapituitary Prolactin: Distribution, Regulation, Functions, y Clinical Aspects. *Endocr Rev.* 17 (6): 639-669.

**BRELJE, T.C.; SCHARP, PE.; LACY, P.E.; OGREN, L.; TAMALES, F.; ROBERTSON, M.; FRIESEN, H.G.; SORENSON, R.L.** 1993. Effect of Homologous Placental Lactogens, Prolactin, and Growth Hormones on Islet  $\beta$ -Cell Division and Insulin Secretion in Rat, Mouse, and Human Islets: Implication for Placental Lactogen Regulation of Islet Function During Pregnancy. *Endocrinology* 132(2): 879-887.

**DE MAZANCOURT, P.; CARNEIRO, E.M.; ATWATER, I.; BOSCHERO, A.C.** 2001. Prolactin Treatment Increases GLUT2 but not G Protein Subunit Content in Cell Membranes from Cultured Neonatal Rat Islets. *FEBS Lett.* 343: 137-140.

**GARCÍA DE LOS RÍOS, M.** 2003. Clasificación, Diagnóstico y Pesquisa de la Diabetes Mellitus, Epidemiología de la Diabetes Mellitus. **In:** Diabetes Mellitus. 2ª ed. Fundación de Investigación y perfeccionamiento médico. Santiago, Chile. pp. 23-41.

**GARTNER, L.P.; HIATT, J.L.** 2002. Texto Atlas de Histología. 2ª ed. Editorial Internamerica McGraw-Hill. México. pp. 397-402.

**GOFFIN, V.; BIRNART, N.; TOURAINE, P.; KELLY, P.A.** 2002. Prolactin: The New Biology of and Old Hormone, *Annu. Rev. Physiol.* 64: 47-67.

**GUYTON, A.C.; HALL, J. E.** 1996. Insulina, Glucagón y Diabetes Mellitus. *In:* Tratado de Fisiología Médica. 9º ed. McGraw-Hill Interamericana, España. pp. 1063-1069.

**HARO-HERNANDEZ, R.; MENDEZ, J.D.** 2002. Neogénesis y Regeneración de las Células  $\beta$  Pancreáticas. *Gac Med Mex.* 138(6): 557-564.

**HUGHES, S.J.; MCSHANE, P.; CONTRACTOR, H.H.; GRAY, D.W.R.; CLARK, A.; JOHNSON, P.R.V.** 2005. Comparison of the Collagen VI Content Within the Islet-Exocrine Interface of the Head, Body, and Tail Regions of the Human Pancreas. *Transplant Proc.* 37: 3444-3445.

**JOHANSSON, M.; MATTSSON, G.; ANDERSSON, A.; JANSSON, L.; CARLSSON P.** 2006 Islet Endothelial Cells and Pancreatic  $\beta$ -Cell Proliferation: Studies in Vitro and During Pregnancy in Adult Rats. *Endocrinology* 147(5): 2315-2324.

**KANDASWAMY, R.; SUTHERLAND, D.E.R.** 2006. Pancreas Versus Islet Transplantation in Diabetes Mellitus: How to Allocate Deceased Donor Pancreata. *Transplant Proc.* 38: 365-367.

**KENDALL, W.F.; COLLINS, B.H.; OPARA, E.C.** 2001. Islet Cell Transplantation for the Treatment of Diabetes Mellitus. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 1(1):109-119.

**LERANT, A.; KANYICKSKA, B.; FREEMAN, M.E.** 2001. Nuclear Translocation of STAT5 and Increased Expression of Fos Related Antigens (FRAs) in Hypothalamic Dopaminergic Neurons After Prolactin Administration. *Brain Res.* 904: 259-269.

**LOEB, W.F.; QUIMBY, F.W.** 1989. The Clinical Chemistry of Laboratory Animals. 1ª ed. Pergamon Press. U.S.A. pp. 285.

**LOUW, J.; WOODROOF, C.W.; WOLFE-COOTE, S.A.** 1997. Distribution of Endocrine Cells Displaying Immunoreactivity for One or More Peptides in the Pancreas of the Adult Vervet Monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Anat Rec.* 247: 405- 412.

**MATSUMOTO, S.; TANAKA, K.; STRONG, D.M.; REEMS, J.A.** 2004. Efficacy of Human Islet Isolation from the Tail Section of the Pancreas for the Possibility of Living Donor Islet Transplantation. *Transplantation* 78(6): 839-843.

**MEURIS, S.; VERLOES, A.; ROBYN, C.** 1983. Immunocytochemical Localization of Prolactin-Like Immunoreactivity in Rat Pancreatic Islets. *Endocrinology* 112(6): 2221-2223.

**MOLDRUP, A.; DOUGLAS, E.; NIELSEN, J.H.** 1993. Effects of Sex and Pregnancy Hormones on Growth Hormone and Prolactin Receptor Gene Expression in Insulin-Producing Cells. *Endocrinology* 133(3): 1165-1172.

**NIELSEN, J.H.; SVENSSON, C.; DOUGLAS, E.; MOLDRUP, A.; BILLESTRUP, N.** 1999. Beta Cell Proliferation and Growth Factors. *J. Mol. Med.* 77: 62-66.

**PAPAS, K.K.; COLTON, C.K.; GOUNARIDES, J.S.; ROOS, E.S.; JAREMA, M.A.; SHAPIRO, M.J.; CHENG, L.L.; CLINE, G.W.; SHULMAN, G.I.; BONNER-WEIR, S.; WEIR, G.C.** 2001. NMR Spectroscopy in Beta cell Engineering and Islet Transplantation. *Ann N Y. Acad. Sci.* 944: 96-119.

**PARRAGUEZ, V.H.; SALES, F.** 1993. Regulación de la Síntesis y Secreción de Prolactina: Efecto de Algunos Factores Ambientales. *Mon Med Vet.* 15(1,2): 33-39.

**PARSONS, J.A.; BRELJE, T.C.; SORENSON, R.L.** 1992. Adaptation of islets of Langerhans to Pregnancy: Increased Islet Cell Proliferation and Insulin Secretion Correlates with the Onset of Placental Lactogen Secretion, *Endocrinology* 130(3): 1459-1466.

**RUSO, L.** 1999. Transplante de Páncreas. Historia y Evolución de las Ideas. *Rev Hosp Maciel.* 4: 16-21.

**ROSENBERGER, L.; WANG, R.; PARASKEVAS, S.; MAYSINGER, D.** 1999. Structural and Functional Changes Resulting from Islet Isolation Lead to Islet Death. *Surgery.* 126 (2):393-398.

**RYAN, E.A.; PATY, B.W.; SENIOR, P.A.; BIGAM, D.; ALFADHLI, E.; KNETEMAN, N.M.; LAKEY, J.R.T.; SHAPIRO, A.M.J.** 2005. Five-Year Follow-Up After Clinical Islet Transplantation. *Diabetes* 54: 2060- 2069.

**SORENSON, R.L.; BRELJE, T.C.; ROTH, C.** 1993. Effects of Steroid and Lactogenic Hormones on Islets of Langerhans: A New Hipótesis for the Role of Pregnancy Steroids in the Adaptation of Islets to Pregnancy. *Endocrinology* 133(5): 2227-2234.

**SORENSON, R.L.; BRELJE, T.C.; HEGRE, O.D.; MARSHALL, S.; ANAYA, P.; SHERIDAN, J.D.** 1987. Prolactin (in vitro) Decreases the Glucose Stimulation Threshold, Enhances Insulin Secretion, and Increases Dye Coupling Among Islet  $\beta$  Cells. *Endocrinology* 121(4): 1447-1453.



**SRINIVASAN, P.; HUANG, G.C.; AMIEL, S.A.; HEATON, N.D.** 2007. Islet Cell Transplantation. *Postgrad. Med. J.* 83: 224-229.

**VASAVADA, R.C.; GONZALEZ-PERTUSA, J.A.; FUJINAKA, Y.; FIASCHI-TAESCH.; COZAR-CASTELLANO.; GARCIA-OCAÑA, A.** 2006. Growth Factors and Beta Cell Replication. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 38: 931-950.

## ANEXOS.

### ANEXO 1: Protocolo de Inmunohistoquímica.

Este protocolo es realizado de acuerdo a la técnica del Laboratorio de Endocrinología y Cirugía Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los pasos del protocolo fueron los siguientes:

- **Paso 1:** Los cortes histológicos se desparafinaron en xilol por 5 a 10 min. Luego para rehidratar los tejidos, éstos fueron sumergidos en una batería de alcohol etílico de grados descendentes (100 %, 95 % y 70 %) por 5 a 10 min en cada uno. Posteriormente los cortes fueron sumergidos en agua destilada por 10 min.
- **Paso 2:** En cada portaobjeto se dibujó con un lápiz hidrófobo (PAP PEN) (EMS®, # 71310) un círculo alrededor del tejido de páncreas con la finalidad de lograr una concentración adecuada de anticuerpos sobre este y evitar que se desperdicie anticuerpos. Luego estos portaobjetos fueron ubicados dentro de una cámara húmeda y a cada uno se le agregó una solución de PBS (Sigma®, D-5773) al interior del círculo marcado anteriormente.
- **Paso 3:** La solución de PBS fue retirada de cada portaobjeto y a cada uno se le agregó peróxido de hidrógeno al 3 % (Diperox®) por 15 min y se lavó con PBS.
- **Paso 4:** Después de retirado el PBS se agregó BSA 1 % a cada corte y se dejó incubando a temperatura ambiente por 30 min.

- **Paso 5:** Transcurrido los 30 min se retiró el BSA 1 % para proceder a agregar el anticuerpo anti-insulina de cobayo a una dilución de 1:300 en BSA 1 %, el cual fue incubado a temperatura ambiente por 2 h.
- **Paso 6:** Transcurrido el tiempo de incubación los portaobjetos fueron lavados 3 veces con PBS y se les agregó el anticuerpo (IgG) anti-cobayo conjugado con peroxidasa a una dilución de 1:200 en BSA 1 %, el cual fue incubado a temperatura ambiente por 2 h.
- **Paso 7:** La reacción de revelado se llevó a cabo utilizando el sustrato cromógeno DAB, el cual se preparó inmediatamente antes de usar de la siguiente según las indicaciones del *Kit*. Esta mezcla se aplicó sobre el círculo marcado en los portaobjetos y luego se dejó incubar a temperatura ambiente unos 2 a 10 min.
- **Paso 8:** Luego de retirar el DAB las placas se lavaron en agua por 10 min.