



Universidad
de Navarra

Estudio de la expresión de ghrelina en el píloro de ratones NOD y NOD/Scid de 32 semanas

Trabajo Fin de Grado

Grado en Bioquímica

Curso 2020-2021

Autor: José María Lanza Arnaiz

Tutor: Dra. María Elena Bodegas Frías

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Diabetes mellitus	2
1.2. Patogenia de la DM1	3
1.3. Modelo animal.....	4
1.4. Ghrelina	5
1.4.1 Introducción	5
1.4.2 Funciones	6
1.5. Regulación de la secreción de insulina.....	7
1.5.1 Regulación de la secreción de insulina mediada por ghrelina	7
1.5.2 Regulación de la secreción de insulina mediada por GLP-1.....	8
1.6. Antecedentes.....	8
1.7. Hipótesis y objetivos	11
2. MATERIAL Y MÉTODOS	11
2.1. MATERIAL.....	11
2.2. MÉTODOS	12
2.2.1 Inmunohistoquímica.....	12
2.2.2 Recuento de células IR-ghrelina	13
2.2.3 Análisis de imágenes	14
2.2.4 Estudio estadístico.....	15
3. RESULTADOS	15
3.1. Estudio de la expresión de ghrelina, mediante técnicas IHQs, en el píloro del estómago de ratones NOD y NOD/Scid de 32 semanas.....	15
3.2. Estudio comparativo, mediante análisis estadísticos, de la densidad de células IR frente a ghrelina en el píloro de ratones NOD y NOD/Scid.....	18

3.3. Estudio comparativo, mediante análisis estadísticos, de la densidad de células IR frente a ghrelina en el píloro de ratones NOD en función de la glucemia (NODN y NODH).....	19
4. DISCUSIÓN.....	20
5. LIMITACIONES	22
6. CONCLUSIONES	22
7. ANEXOS.....	23
Anexo I. Protocolo de inmunohistoquímica de ghrelina (A-468).....	23
Anexo II. Protocolo de escaneo de muestras.....	25
8. BIBLIOGRAFÍA.....	26

ABREVIATURAS

NOD: Non-obese diabetic

Scid: Severe combined immunodeficiency

NODN: NOD normoglucémico

NODH: NOD hiperglucémico

DM: Diabetes mellitus

DM1: Diabetes mellitus tipo 1

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

IR: Inmunorreactivo

IHQ: Inmunohistoquímica

STZ: Estreptozotocina

TFG: Trabajo fin de grado

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es un conjunto de enfermedades metabólicas caracterizada por una concentración elevada de glucosa en sangre y en orina; debido a una disminución en la secreción de la hormona insulina o a una deficiencia en la acción de la misma.

Los non-obese diabetic mice (ratones NOD) desarrollan DM1 de manera espontánea con una patología similar a la que cursa en el ser humano. En este modelo animal se produce un ataque autoinmune contra las células beta pancreáticas provocando una infiltración linfocitaria en los islotes de Langerhans, que dará lugar a una insulinitis y a la destrucción del área endocrina del órgano.

La ghrelina es una hormona peptídica que es sintetizada predominantemente en el estómago y cuyas funciones principales son regular el apetito e inhibir la liberación de insulina por parte de las células beta pancreáticas. Por lo contrario, las incretinas como GLP-1 o GIP son hormonas intestinales cuyo efecto más importante es la estimulación en la secreción de insulina.

En este trabajo se ha estudiado la expresión de la ghrelina, mediante técnicas inmunohistoquímicas, en el píloro de ratones NOD y NOD/Scid de 32 semanas de edad. Para ello, se han empleado cortes histológicos de 9 ratones NOD y 9 ratones NOD/Scid, utilizados como control. Tras el recuento de las células inmunorreactivas (IR) para ghrelina en el píloro de los ratones se ha calculado la densidad celular por mm² de mucosa pilórica.

Se ha observado una disminución no significativa de la densidad de células IR para ghrelina en el píloro de ratones NOD con respecto al grupo control. También se ha observado una disminución no significativa de la densidad de células IR para ghrelina en el píloro de ratones NOD hiperglucémicos (NODH) con respecto a los ratones NOD normoglucémicos (NODN) de 32 semanas de edad.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es un conjunto de patologías metabólicas caracterizadas por una hiperglucemia crónica acompañada de desequilibrios en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas que se genera como resultado de un defecto en la secreción y/o acción de la insulina (1).

Se estima que la diabetes afecta al 9.3% de la población mundial. El número de personas que sufren de esta condición ha aumentado durante los últimos años, superando los 460 millones en 2019, casi 100 millones de personas más que en 2011 (2).

La **sinomatología** clásica de la DM se caracteriza por la polidipsia (aumento de la ingesta de líquidos), la polifagia (aumento de la ingesta de alimentos), la poliuria (aumento del volumen urinario) y la pérdida de peso.

La hiperglucemia crónica no controlada puede dar lugar a una serie de **complicaciones** como retinopatías acompañadas de una pérdida de visión, nefropatías, neuropatías periféricas que pueden manifestarse como ulceraciones en los pies así como neuropatías autonómicas causando síntomas en diversos sistemas como el gastrointestinal, el cardiovascular o el genitourinario. Además, una hiperglucemia aguda no controlada puede desencadenar una cetoacidosis diabética o un síndrome hiperosmolar no cetósico (1,3).

En base a los criterios del comité de expertos de la Asociación de Diabetes Americana (ADA), **la diabetes se puede clasificar en cuatro tipos diferentes (4):**

- 1) **DM tipo I (DM1):** Afecta entorno al 5-10% de los casos y está causada por una reacción autoinmune que ataca a las células beta del páncreas, encargadas de producir insulina. Como consecuencia, el organismo no es capaz de producir insulina o no produce la suficiente.
- 2) **DM tipo II (DM2):** Afecta al 90-95% de los casos y está causada por una producción insuficiente o una acción ineficaz de la insulina. En algunos casos, esta patología se puede revertir mediante un cambio en el estilo de vida, bien sea en la actividad física, en la alimentación o mediante el uso de tratamientos farmacológicos.

3) DM gestacional: Aproximadamente el 7% de los embarazos (más de 200.000 embarazos anuales) se ve complicado por este tipo de DM. La DM gestacional se desarrolla como consecuencia de los efectos de hormonas placentarias (lactógeno placentario, progesterona y estrógenos) en la acción de la insulina, disminuyendo la sensibilidad de esta en el organismo.

Esta alteración suele desaparecer tras el parto, aunque en ocasiones puede derivar en una DM2 si no se controla adecuadamente. La DM gestacional está asociada a un incremento de las complicaciones durante el embarazo y en la vida postnatal (5,6).

4) Otros tipos de diabetes: Este grupo de patologías afectan a menos del 1% de los casos y están producidas por: mutaciones en las células β (diabetes MODY), mutaciones que afectan a la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino como la pancreatitis, endocrinopatías como el síndrome de Cushing, infecciones víricas como infecciones por citomegalovirus, diabetes inducidas por drogas o químicos, además de síndromes genéticos que pueden desencadenar la aparición de diabetes como los síndromes de Turner o Klinefelter.

Existen diversos criterios para el **diagnóstico** de esta patología, entre ellos: tener una glucosa ≥ 126 mg/dL (sin haber tenido una ingesta calórica en las últimas 8 horas), poseer unos niveles de glucosa plasmática ≥ 200 mg/dL dos horas después de una sobrecarga oral de glucosa (75g), poseer unos valores de hemoglobina glucosilada (HbA1c) $\geq 6.5\%$ o presentar síntomas clásicos de hiperglucemia junto con un análisis de glucosa tomada al azar ≥ 200 mg/dL (4).

1.2. Patogenia de la DM1

A pesar del amplio número de estudios realizados sobre esta afección, aún se desconocen las causas exactas de la patología. El desarrollo de la DM1 puede verse predispuesto por factores genéticos como polimorfismos en el gen PTPN22 o en los locus IDDM1 e IDDM2, así como factores ambientales como infecciones bacterianas o víricas, toxinas y estrés que pueden desencadenar la aparición de la patología. Estos factores pueden provocar una reacción autoinmune mediada por una reacción celular o humoral (7).

Esta reacción autoinmune está dirigida contra antígenos específicos de las células- β produciendo una infiltración en los islotes de Langerhans, denominada insulitis. Esta infiltración está mediada por diversas poblaciones celulares como linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, linfocitos B, células NK, macrófagos y células dendríticas. La destrucción de las células- β pancreáticas se lleva a cabo mediante la apoptosis celular mediada por FAS-FAS ligando. Además, en el transcurso de la reacción autoinmune se desarrollan un gran número de anticuerpos frente a antígenos propios como anticuerpos anti-islotes, anti-insulina, etc. (8,9).

La insulitis se produce de forma gradual y las manifestaciones clínicas comienzan cuando se ha perdido entorno al 20-30% de la masa celular de células- β pancreáticas (9,10).

1.3. Modelo animal

El empleo de modelos animales en el estudio de la DM1 es vital dada la dificultad que supone el estudio de esta patología en el ser humano. El páncreas, por una parte, es un órgano de difícil acceso y su manipulación puede acarrear grandes complicaciones en el paciente. Además, la DM es una patología cuyo comienzo se da sin ningún tipo de manifestación clínica predecible, de manera que el estudio de la patología en estadios iniciales es inviable.

Por ello, en la actualidad, existen tres tipos de modelos animales para el estudio de la DM1:

- 1) **Modelos inducidos.** Estos modelos pueden generarse mediante la extirpación del páncreas, uso de químicos como la estreptozotocina así como el aloxano o agentes infecciosos (11,12).
- 2) **Modelos espontáneos.** Estos modelos se presentan en varias especies. Las especies más utilizadas en ratas son las Bio-Breeding (BB) y Long-Evans Tokushima (LETL), así como sublíneas de este último como las Komada Diabetes Prone (KDP), en el que el 100% de las ratas desarrollan insulitis antes de los 220 días de edad. En el caso del ratón, el modelo más empleado es el ratón Non-Obese Diabetic (NOD) (13,14).
- 3) **Modelos modificados genéticamente (transgénicos y knock out).** Estos modelos permiten estudiar la función que tiene una molécula en concreto en el desarrollo de la patología. Esto se realiza mediante el análisis de la expresión o mediante el bloqueo local o sistémico de la molécula.

En los estudios con modelos animales de DM1, se utilizan en paralelo animales control que por sus características genéticas o su fenotipo inmunodeficiente son resistentes a la enfermedad como por ejemplo el ratón NOD-Severe Combined Immunodeficiency (NOD-Scid) ([15](#)).

1.4. Ghrelina

1.4.1 Introducción

La ghrelina es una hormona peptídica de 28 aminoácidos cuya síntesis predomina en las células oxínticas P/D1 de la mucosa del estómago (similares a las células X/A murinas), aunque también es sintetizada en otros tejidos como la hipófisis, ciertas áreas del cerebro (hipocampo, hipotálamo y córtex cerebral), el intestino delgado, las glándulas adrenales, el páncreas, etc. ([16-19](#)).

Este péptido fue identificado por primera vez por Masayasu K. y Kenji K. en 1999 como un ligando endógeno del receptor secretagogo de la hormona del crecimiento (GHS-R) ([16](#)). Un año después, Heiman M. y Tschöp M. describieron este péptido como una hormona orexigénica capaz de regular los circuitos neuronales que modulan la saciedad ([20](#)).

El gen de la ghrelina humana codifica un precursor peptídico de 117 aminoácidos, la preproghrelina, que sufre diversas modificaciones postraduccionales obteniendo finalmente la ghrelina. Para activar el receptor de la ghrelina (GHSR1a), el péptido necesita someterse a una modificación que consiste en la acilación del grupo hidroxilo en la Ser3. La adición de un ácido graso de cadena lateral (mayoritariamente de ocho carbonos) en esta posición es crucial para desempeñar las funciones fisiológicas del péptido ([21,22](#)).

De esta forma, la ghrelina puede encontrarse en el plasma de dos formas diferentes: como acyl-ghrelina o como des-acyl ghrelina. La des-acyl ghrelina es la forma predominante que circula en el organismo y es la forma carente de la n-octanoilación ([23,24](#)).

Aunque esta modificación en la región N-terminal es necesaria para que el péptido desempeñe un amplio rango de funciones fisiológicas, la forma no octanoilada también puede desempeñar otras funciones como funciones antiapoptóticas además de hipotensoras en el sistema cardiovascular ([23,25,26](#)).

1.4.2 Funciones

La ghrelina desempeña un amplio repertorio de funciones fisiológicas. Por una parte, actúa directamente sobre la hipófisis incrementando la secreción de la hormona del crecimiento (GH). Asimismo, la ghrelina actúa sobre las neuronas aferente vagales en el estómago cuyas proyecciones se extienden hasta una región del tronco encefálico (núcleo del tracto solitario o NTS). Esta región participa en los reflejos viscerales y conecta con el centro regulador del apetito del hipotálamo (27–29). Por otra parte, la ghrelina también actúa sobre las células del núcleo arcuato (ARC) del hipotálamo, incrementando la síntesis de péptidos orexigénicos como el NPY y el AgRP (péptido r-agouti) y por tanto, aumentando el apetito (24,30). La ghrelina en el hipotálamo también se encarga de estimular la secreción de la hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH).

Dentro del sistema gastrointestinal, la ghrelina participa en la secreción gástrica y en la síntesis de óxido nítrico y prostaglandinas, que actúan como vasodilatadores protegiendo la mucosa gástrica (26,31). Además se ha demostrado, en modelos animales murinos, que la ghrelina reduce la producción de enzimas pancreáticas, indicando también que participa en la regulación de las funciones digestivas del páncreas (32). También ejerce un efecto insulínostático en los islotes de Langerhans, por lo que es muy interesante estudiar las variaciones de la expresión de la ghrelina en la DM.

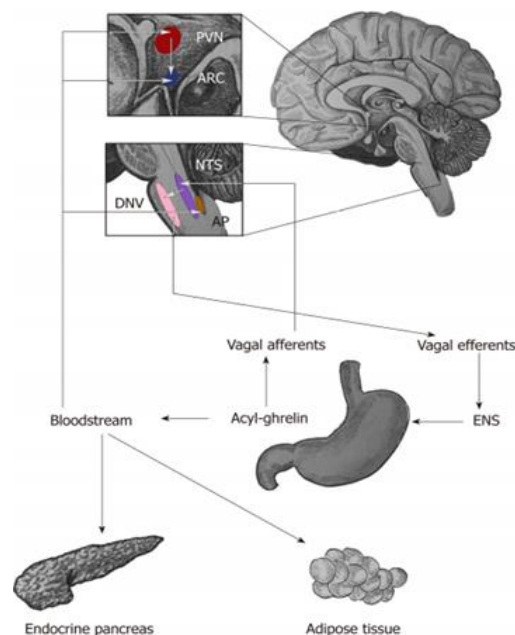


Figura 1. Representación de las diferentes dianas en las que la ghrelina ejerce su acción. Como por ejemplo el núcleo del tracto solitario (NTS) del tronco cerebral, el núcleo arcuato del hipotálamo, el páncreas, etc. **Koutouratsas T. et al. (2019)**

1.5. Regulación de la secreción de insulina

1.5.1 Regulación de la secreción de insulina mediada por ghrelina

Los mecanismos de acción por los que la ghrelina ejerce su efecto insulinostático siguen siendo objeto de controversia. Diversos estudios indican que la ghrelina ejerce su acción directamente sobre las células- β pancreáticas, donde la unión de la ghrelina con su receptor GHS-R estimula a $G\alpha_{i2}$, disminuyendo la concentración de cAMP y por tanto, activando los canales de potasio dependientes de voltaje.

De esta manera, la supresión del potencial de acción dará lugar a la inhibición del incremento de Ca^{2+} intracelular, impidiendo la degranulación de las células- β y por consiguiente la liberación de insulina (33,34). (Figura 2)

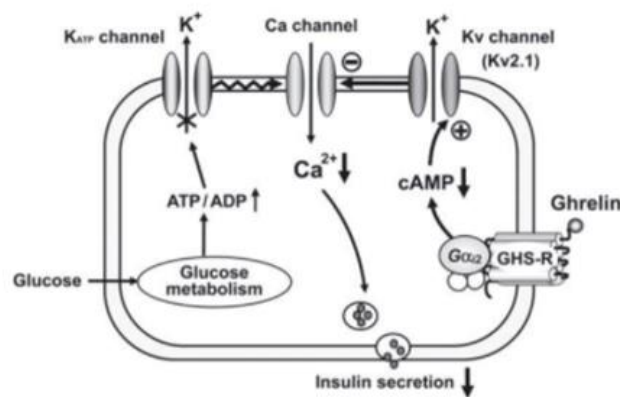


Figura 2. Representación de la acción de la ghrelina sobre las células beta pancreáticas, disminuyendo la liberación de insulina. Yada T. et al. (2014)

Asimismo, otros estudios apuntan que la inhibición de la liberación de insulina mediada por ghrelina se podría basar en la formación de un heterodímero de GHSR1a con el receptor de somatostatina (SST5) (35). Estudios de transcriptómica realizados en 2016 por DiGruccio et al. revelaron que GHSR1a se ve expresado selectivamente en las células- δ pancreáticas.

En este mismo estudio, el grupo demostró que la ghrelina es capaz de inducir la despolarización de las células- δ y promover la liberación de somatostatina mediada por glucosa. En base a estos resultados los autores hipotetizaron que la ghrelina no actuaba de manera directa sobre las células- β , sino que promueve la inhibición de la liberación de insulina mediante la activación de la secreción de las células- δ (32,36).

En resumen, se ha demostrado que la ghrelina posee un efecto inhibitorio en la actividad secretora de las células- β .

1.5.2 Regulación de la secreción de insulina mediada por GLP-1

El GLP-1 es un péptido de 31 aminoácidos derivado del gen del proglucagón, que es secretado por las células L, localizadas principalmente en la porción distal del tubo digestivo (íleon y colon). Las acciones reguladoras por parte de las incretinas (GLP-1 y GIP) en la regulación de la homeostasis glucídica están mediadas por la unión de estas a sus respectivos receptores logrando así la activación de las células- β pancreáticas, estimulando la liberación de insulina (37). Por otra parte, en estudios tanto *in vivo* como *in vitro* se ha demostrado que GLP-1 aumenta la replicación de las células- β e inhibe la muerte celular programada de estas promoviendo su expansión en roedores (38). Además, actúa en otros órganos como el cerebro, donde ejerce un efecto neuroprotector y anorexigénico, inhibiendo la ingesta de alimentos (39,40).

Los mecanismos por los que GLP-1 ejerce su función homeostática de los niveles de glucosa en sangre son diversos. Por una parte, GLP-1 favorece la transcripción del gen de la insulina así como la estabilización del transcrito. Además, para que este ejerza su función como secretagogo de insulina, las células- β deben estar expuestas a la glucosa, ya que el GLP-1 actúa como sensibilizador de las vías dependientes de glucosa y no como modulador de las mismas (41). La unión de GLP-1 a su receptor en las células- β induce la producción de AMPc, activando vías en las que intervienen PKA y Epac (42). Posteriormente, como consecuencia de la activación de estas vías de señalización, se dará la inhibición de los canales de K^+ y el cierre de los canales K_v , produciendo la despolarización de la membrana celular aumentando el flujo de Ca^{+2} al citosol. Este aumento en la concentración intracelular de Ca^{+2} en última instancia inducirá la secreción de los gránulos de insulina (43).

En resumen, el GLP-1 es una incretina que actúa sobre las células- β pancreáticas y cuya función principal es la estimular la liberación de insulina, además de promover la replicación de estas células e inhibir la muerte celular de las mismas.

1.6. Antecedentes

A continuación, se explicarán los resultados de los artículos científicos encontrados tras realizar una búsqueda bibliográfica sobre el estudio de la expresión de ghrelina y GLP1, mediante IHQ, en modelos animales de DM1.

Rauma et al. observaron que la densidad de células IR frente a la ghrelina, en el estómago de ratones NOD diabéticos y prediabéticos de 22 semanas, presentaba una disminución no significativa en comparación a la densidad celular obtenida en el grupo control, en el que se emplearon ratones BALB/cJ de la misma edad y sexo ($p = 0.4$) (44). (Figura 3A)

Asimismo, en un estudio realizado por Masaoka et al., se observó una disminución significativa en la densidad de células IR frente a la ghrelina en la región del fundus del estómago de ratas Wistar de 8 semanas tratadas con estreptozotocina (STZ) ($p < 0.05$). El grupo control empleado en el estudio estaba constituido por ratones Wistar a los que se les administró suero fisiológico en vez de STZ, mientras que el tercer grupo de estudio se trata de ratones Wistar a los se les administró STZ de manera conjunta con insulina (45). (Figura 3B)

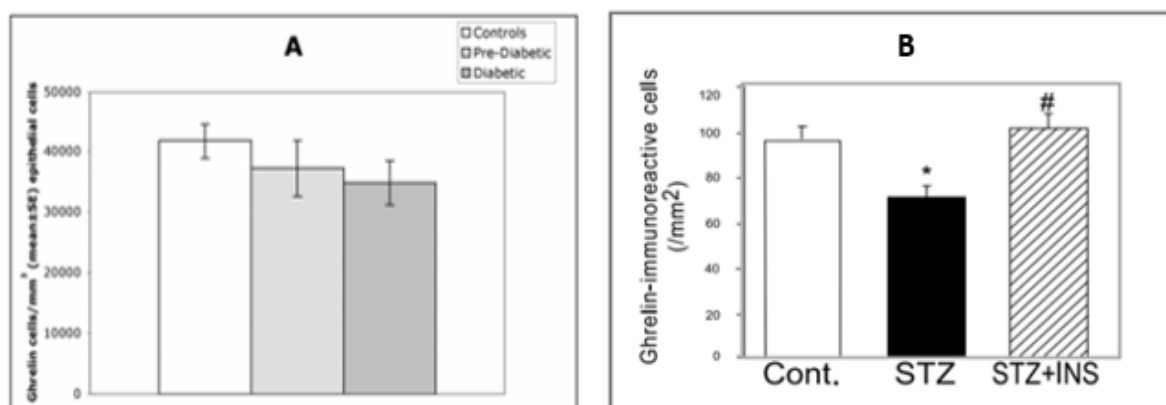


Figura 3. Representación gráfica de la comparación de densidades de células IR frente a ghrelina en el estómago de ratones control (BALB/cJ) y ratones NOD prediabéticos y diabéticos (A). Representación gráfica de la comparación de densidades de células IR frente a ghrelina en el estómago de ratones Wistar control, tratados con STZ y tratados con STZ a los que se les administró insulina (B).

Con respecto al GLP-1, hormona que al contrario que la ghrelina, estimula la secreción y síntesis de insulina, los únicos trabajos realizados mediante técnicas IHQs son los llevados a cabo en el departamento: Alcaraz (2012) y Asurmendi (2018). Los trabajos se realizaron en el yeyuno de ratones NOD y NOD/Scid de 5, 8, 20 y 32 semanas.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes (37,46):

- 1) Los ratones NOD de 5 semanas presentan un aumento en la densidad de células IR para GLP-1 con respecto al grupo control (NOD/Scid) ($p < 0.01$).
- 2) Los ratones NOD de 8 y 20 semanas presentan una disminución en la densidad de células IR para GLP-1 de la mucosa del yeyuno con respecto a los ratones NOD-Scid de la misma edad ($p < 0.05$).

- 3) Los ratones de 32 semanas con una DM más avanzada, en cambio, no presentan diferencias en la densidad de células IR para GLP-1 con respecto al grupo control (NOD/Scid).

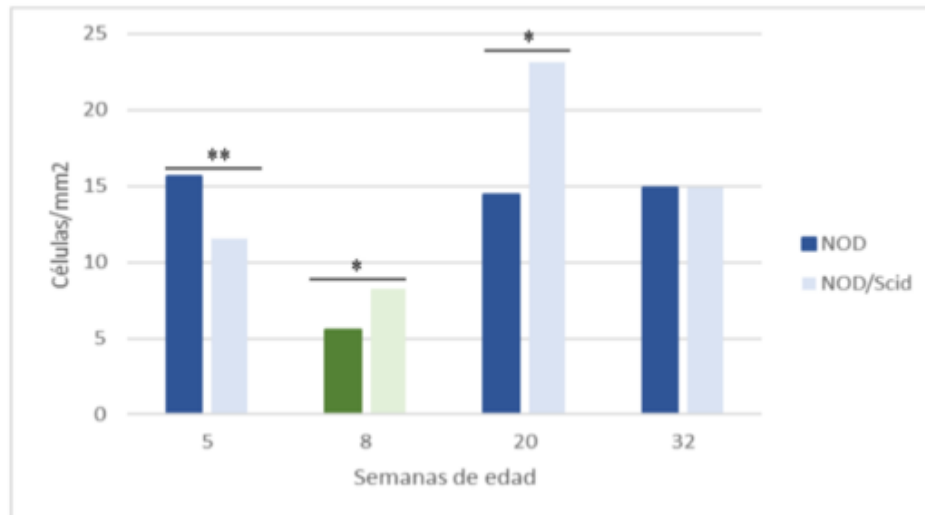


Figura 4. Representación gráfica de la comparación de densidades de células IR frente a GLP-1 en el yeyuno de ratones NOD y NOD/Scid de diferentes edades. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$. Esta gráfica fue realizada en base a los datos obtenidos por los trabajos de la Dra. Alcaraz (azul) y Asurmendi M. (verde). (Asurmendi M., 2018)

Estos resultados concuerdan en cierta manera con el curso normal de la DM, donde en las primeras fases de la patología la población de células L (productoras de GLP-1) se debería encontrar aumentada, ya que el organismo detecta que está perdiendo masa celular beta y por tanto intentaría compensar la pérdida. Por lo contrario, en la DM más avanzada, se observaría una disminución en la densidad de células IR para GLP-1.

La densidad de células IR para GLP-1 observada en los ratones NOD de 32 semanas no concuerda con el curso esperado de la DM, ya que debería verse disminuida como ocurre en los ratones de 8 y 20 semanas.

Los ratones NOD de 20 semanas fueron clasificados atendiendo a su glucemia en normoglucémicos, hiperglucémicos y diabéticos. Al comparar la densidad de células IR para GLP1 en el yeyuno de estos subgrupos, Alcaraz observó que existía una disminución significativa en el grupo de los ratones hiperglucémicos con respecto a los ratones normoglucémicos.

1.7. Hipótesis y objetivos

Como se ha mencionado anteriormente, existe una disminución no significativa entre la densidad de células IR frente a ghrelina de ratones NOD diabéticos y control (BALB/cJ) de 22 semanas. En este trabajo se va a estudiar la expresión de ghrelina en la región pilórica de ratones NOD y NOD/Scid de 32 semanas (ratones que presentan un estadio más avanzado de DM1 en comparación a los ratones del estudio descrito anteriormente). De esta manera, se espera encontrar una disminución significativa en la densidad de células IR para ghrelina, ya que cuanto mayor sea el avance de la patología, menor será la densidad de células IR frente a ghrelina.

Dentro de los ratones NOD podemos diferenciar dos subgrupos en función de los niveles de glucosa de los mismos, dividiéndolos en ratones NOD hiperglucémicos (NODH) y ratones NOD normoglucémicos (NODN). Comparando ambos subgrupos, se espera observar una disminución significativa de la densidad de células IR frente a ghrelina en el grupo de los ratones NODH con respecto a los NODN de la misma edad.

Para comprobar estas hipótesis se propusieron los siguientes objetivos:

- 1) Estudio de la expresión de ghrelina, mediante técnicas IHQs, en el píloro del estómago de ratones NOD y NOD/Scid de 32 semanas.
- 2) Estudio comparativo, mediante análisis estadísticos, de la densidad de células IR frente a ghrelina en el píloro de ratones NOD y NOD/Scid.
- 3) Estudio comparativo, mediante análisis estadísticos, de la densidad de células IR frente a ghrelina en el píloro de ratones NOD en función de la glucemia (NODH y NODN).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL

Para realizar este estudio se utilizaron preparaciones de cortes longitudinales que contenían la región pilórica del estómago, el duodeno y el yeyuno de ratones NOD y NOD/Scid de 32 semanas. Se han utilizado 9 ratones NOD (R.70, R.72, R.74, R.77, R.78, R.80, R.81, R.168 y R.169) y 9 ratones NOD/Scid (R.83, R.85, R.86, R.87, R.88, R.89, R.91, R.92 y R93).

El ratón NOD es un modelo animal de DM1 que desarrolla la patología de manera espontánea y similar a la que cursa el ser humano. El ratón NOD/Scid en cambio es una variante que generalmente se emplea como control en los experimentos ya que no es capaz de desarrollar la patología debido a su carácter inmunodeficiente (47).

Los cortes empleados en este estudio fueron obtenidos gracias al trabajo de la Dra. Alcaraz, que se encargó de todos los procedimientos requeridos para la obtención de las muestras (mantenimiento de los animales, medición de la glucemia y sacrificio de los mismos) y a D. Javier García, que se encargó del procesamiento de las muestras (inclusión y corte).

Se utilizaron los cortes número 3, 11 y 18 de una serie de veinte cortes consecutivos de cada uno de los 18 ratones (**Figura 5**), haciendo un total de 54 cortes (27 del grupo NOD y 27 del NOD/Scid). Estos cortes son de 4 μm de espesor y la separación entre cortes seleccionados es de entorno a las 26 μm .

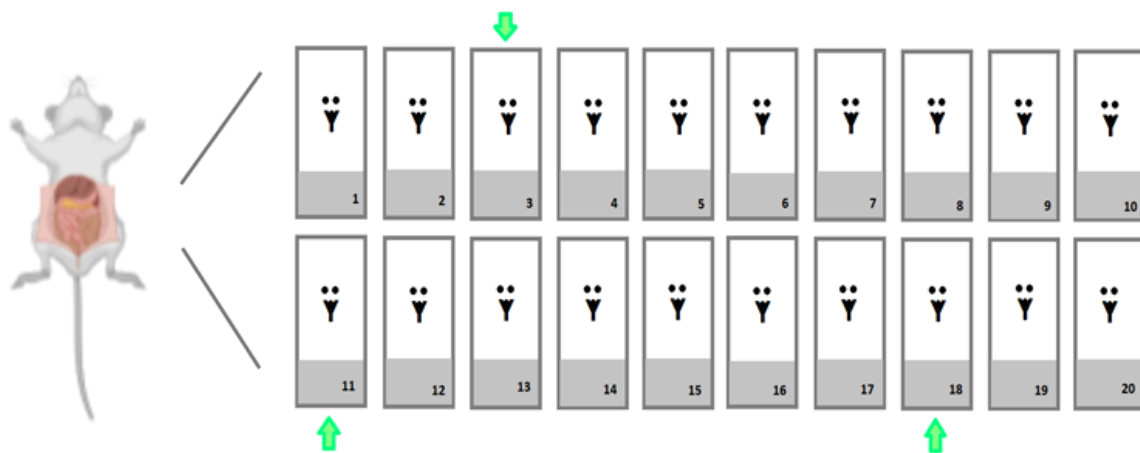


Figura 5. Representación de los cortes seleccionados (flecha verde) de una serie de 20 cortes consecutivos realizados en el tracto gastrointestinal de ratones NOD y NOD/Scid de 32 semanas.

2.2. MÉTODOS

2.2.1 Inmunohistoquímica

La técnica inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica que nos permite detectar la expresión de un antígeno *in situ*, en este caso la ghrelina, a nivel tisular o celular mediante el empleo de anticuerpos que reconocen específicamente la molécula de estudio.

Existen dos tipos de IHQs; las de tipo directo son aquellas en las que se utiliza un único anticuerpo, mientras que en las de tipo indirecto se emplean dos o más anticuerpos.

La técnica de elección para el estudio de la expresión de ghrelina en la región pilórica del estómago fue el sistema EnVision™ Dako K4011, siendo este de tipo indirecto.

Para la realización de la técnica se emplearon dos anticuerpos:

- 1) **Anticuerpo primario** anti-ghrelina monoclonal de ratón obtenido en conejo (Phoenix Pharmaceuticals Inc. N.º catálogo: H-031-30). El anticuerpo se utilizó a varias diluciones (1:200, 1:400 y 1:600) para determinar cuál de ellas era la dilución óptima.
- 2) **Anticuerpo secundario**: Polímero HRP anti-conejo. Este es un polímero de dextrano que posee anticuerpos peroxidados capaces de reconocer la fracción constante de nuestro anticuerpo primario.

Posteriormente, a la hora de realizar el revelado se utilizó una solución de glucosa oxidasa, reducible por la acción de la peroxidasa presente en el polímero HRP, generando un marcaje que nos permite visualizar aquellas células del tejido que sean IR frente a la ghrelina.

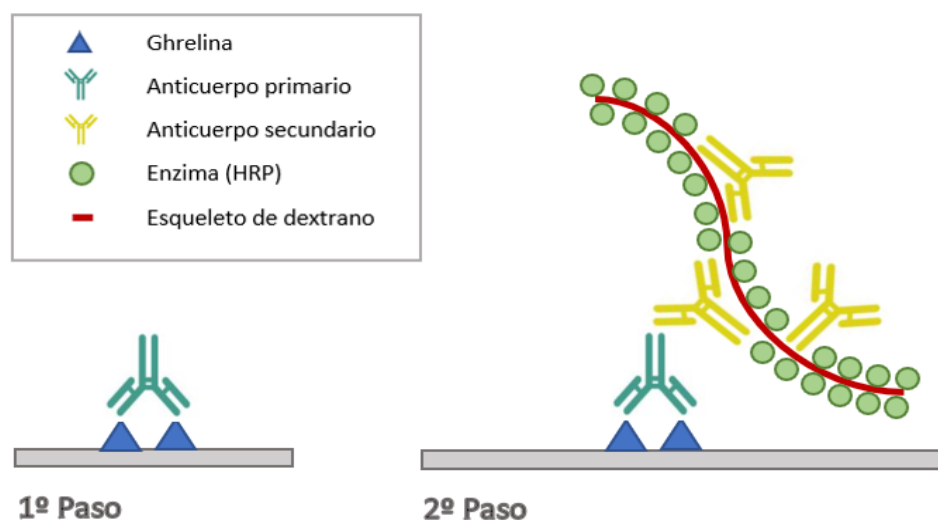


Figura 6. Representación gráfica de la inmunohistoquímica empleada en el estudio.

Los reactivos y el protocolo se detallan en el siguiente anexo ([Anexo I](#)).

2.2.2 Recuento de células IR-ghrelina

El recuento de células IR para la ghrelina en la mucosa del área pilórica de cada preparación se llevó a cabo mediante el conteo manual a través de la observación directa al microscopio óptico con el objetivo de 20X.

2.2.3 Análisis de imágenes

a) Escaneo de las preparaciones

Para determinar el área de la mucosa pilórica de cada ratón se escaneó la preparación n° 11, utilizando el escáner Aperio CS2 Leica del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Se escanearon un total de 18 preparaciones siguiendo el procedimiento recogido en el [Anexo II](#).

b) Cuantificación del área inmunorreactiva

El programa QuPath es un software digital de análisis de imágenes ampliamente utilizado en patología que permite realizar análisis cuantitativos y abrir preparaciones virtuales con una gran resolución. En este estudio, dicha herramienta ha permitido analizar las muestras y determinar el área de la túnica mucosa pilórica de las mismas (**Figura 7**).

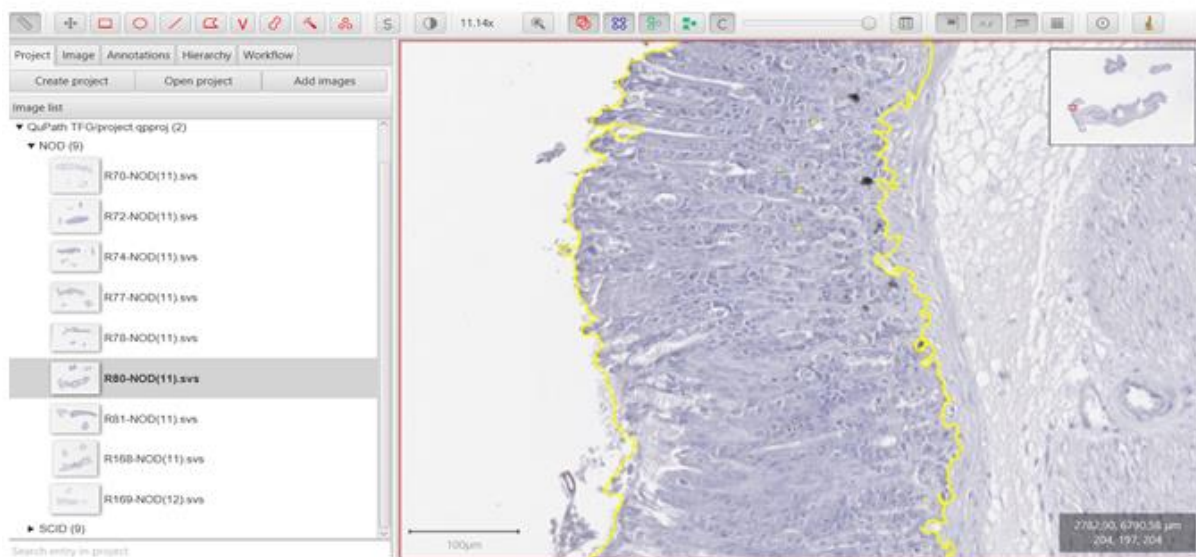


Figura 7. Captura de pantalla del programa QuPath en el que se observa seleccionada el área de la túnica mucosa pilórica.

La selección de la túnica mucosa se realizó de manera manual mediante el empleo de la herramienta "Wand Tool". Esta herramienta permite seleccionar poco a poco pequeñas regiones del tejido generando una gran área seleccionada en la que finalmente se indicará las dimensiones de la misma. Una vez obtenido este valor, se procedió a calcular la densidad de células IR frente a ghrelina de cada ratón, dividiendo la media de los valores de células IR obtenidas en las tres preparaciones (3, 11 y 18) de cada ratón entre el valor en mm² de área pilórica obtenida en el programa en la preparación n° 11.

2.2.4 Estudio estadístico

Tras calcular la densidad de células IR frente a ghrelina en la túnica mucosa del área pilórica de cada ratón se realizó el estudio estadístico mediante el programa R Studio. En primer lugar, para comprobar la normalidad de los valores obtenidos, los datos fueron sometidos a un estudio mediante la función qqnorm, que genera un gráfico Q-Q que compara los cuantiles de los datos de estudio con los cuantiles teóricos de la distribución normal estándar.

La normalidad se verificó mediante la prueba Shapiro-Wilk, en el que si la significación está por encima de 0.05, se asumirá la normalidad de las muestras.

Posteriormente, en el estudio de los ratones NOD/NOD-Scid, se realizó un test de t-student para dos muestras independientes de varianzas distintas en el que se compararon las medias de los diferentes grupos. En cambio, en el estudio de los ratones NODN/NODH, se realizó un t-student para muestras con varianzas iguales, por lo que se empleó un t-test convencional.

3. RESULTADOS

3.1. Estudio de la expresión de ghrelina, mediante técnicas IHQs, en el píloro del estómago de ratones NOD y NOD/Scid de 32 semanas

La técnica IHQ se realizó empleando diferentes diluciones del anticuerpo primario con el fin de obtener aquella dilución a la cual se puedan observar de manera adecuada las células IR para ghrelina y se emplee la menor cantidad de anticuerpo posible, abaratando el coste de la técnica. La dilución empleada en el estudio inmunohistoquímico fue 1:600, siendo esta la que mejor resultados obtuvo (**Figura 8**).

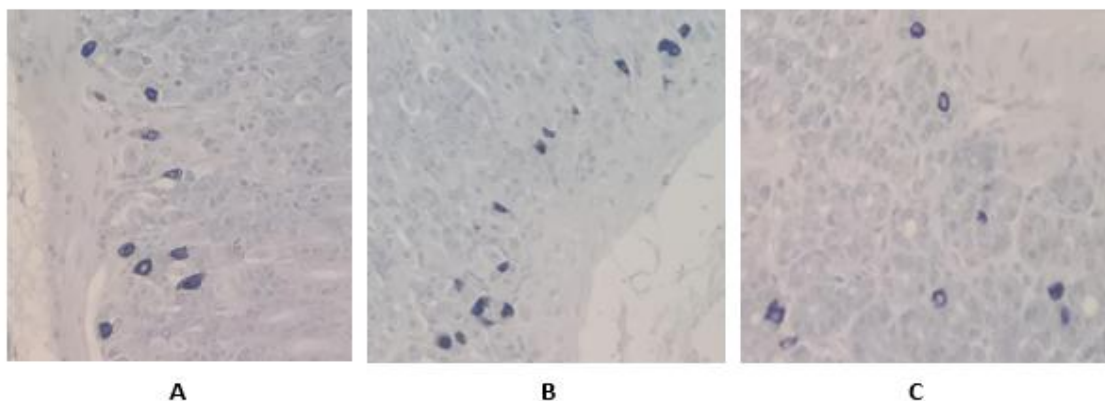


Figura 8. Imágenes tomadas al microscopio con el objetivo de 10X de las diferentes diluciones empleadas en la IHQ. Dilución 1:200 (A), 1:400 (B) y 1:600 (C).

Se observaron células IR frente a ghrelina en el estómago, duodeno y yeyuno de los dos grupos de estudio, los ratones NOD y NOD/Scid. Las células IR para ghrelina se localizan en el fondo de las glándulas pilóricas y en las criptas de Lieberkühn del duodeno y yeyuno (**Figura 9**).

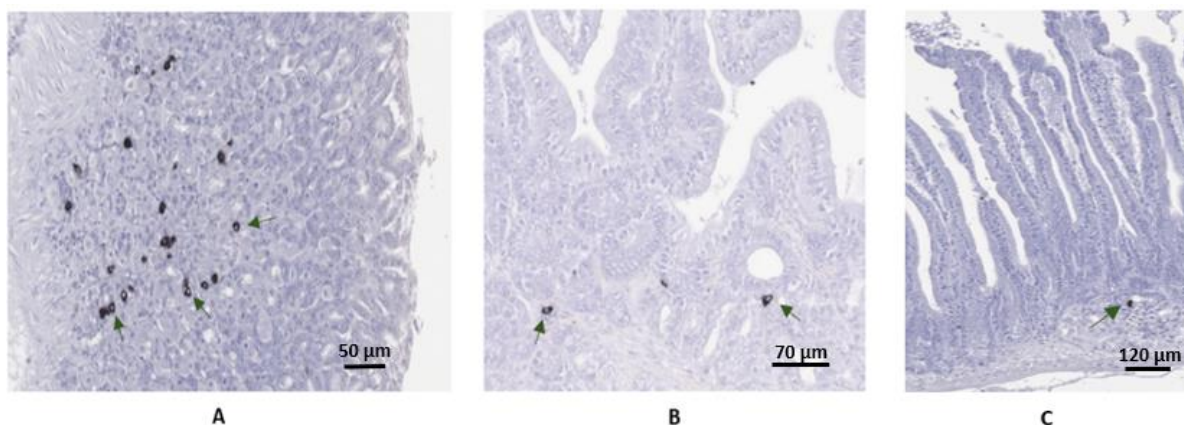


Figura 9. Imágenes tomadas al microscopio de células IR frente a ghrelina (señaladas con una flecha) de la túnica mucosa del píloro (A), del duodeno (B) y del yeyuno (C) de un ratón NOD/Scid.

Una vez observadas las muestras, se determinó la media de células IR para ghrelina mediante el cálculo del promedio del número de células obtenidas en los tres cortes de cada ratón. La densidad celular fue calculada en base a la media celular y el área de la mucosa pilórica, medida en el corte n° 11, de cada ratón. Los datos se ven reflejados en las **Tablas 1-2**.

Estudio pilórico			
SCID	Media celular	Área (mm ²)	Densidad celular (célula/mm ²)
R.83	NO	NO	NO
R.85	11	1437,44	0,00765
R.86	45	2761,48	0,01630
R.87	60	1091,82	0,05495
R.88	NO	NO	NO
R.89	39	2557,69	0,01538
R.91	268	7767,84	0,03446
R.92	159	7194,71	0,02205
R.93	26	3091,30	0,00841

Tabla 1. Representación de la media de células IR para ghrelina del recuento de los tres cortes de cada ratón NOD-Scid y la densidad celular en función del área pilórica del mismo.

Estudio pilórico			
NOD	Media celular	Área (mm ²)	Densidad celular (célula/mm ²)
R.70	53	3040,75	0,01743
R.72	13	1120,20	0,01131
R.74	1	731,48	0,00137
R.77	17	1718,34	0,00970
R.78	11	1498,59	0,00712
R.80	58	3396,19	0,01708
R.81	3	651,67	0,00460
R.168	30	3079,71	0,00985
R.169	NO	NO	NO

Tabla 2. Representación de la media de células IR para ghrelina del recuento de los tres cortes de cada ratón NOD y la densidad celular en función del área pilórica del mismo.

No se pudo calcular la densidad de células IR frente a ghrelina de algunos ratones (R.169, R.83 y R.88) ya que en los cortes del estómago de estos ratones no se observa la túnica mucosa de la región pilórica. (**Figura 10**).

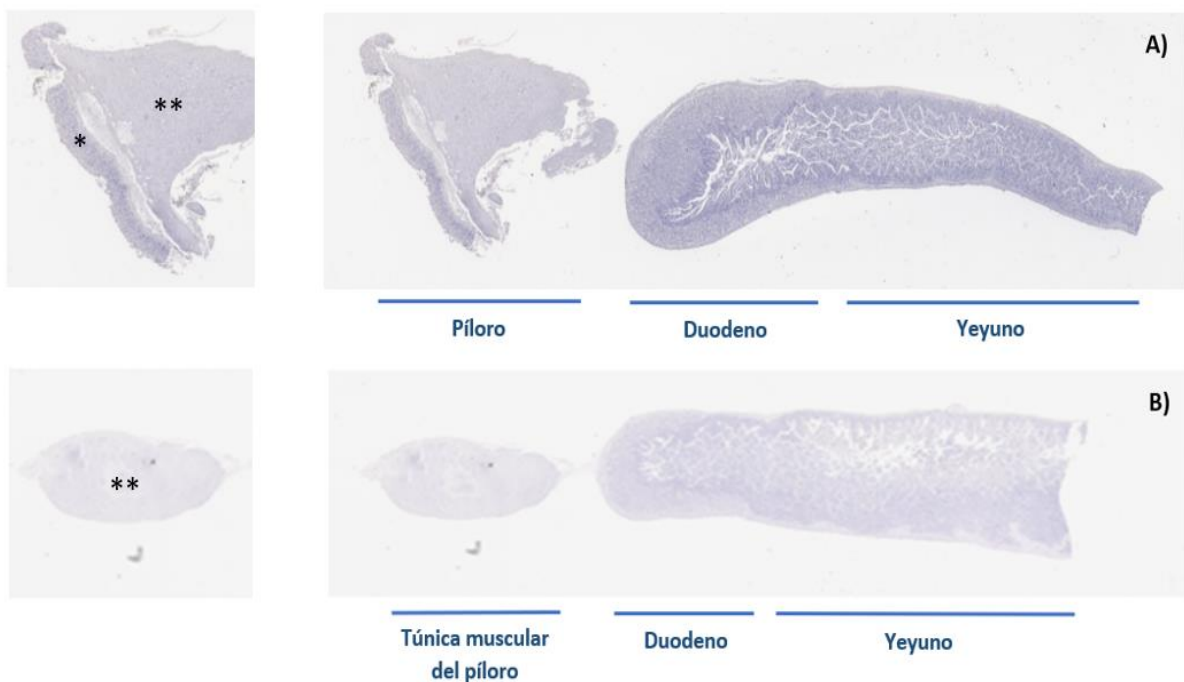


Figura 10. Comparación entre una preparación que contiene la túnica mucosa de la región pilórica (**A**) frente a una que lo ha perdido a lo largo del procesamiento de la muestra (**B**). Anotaciones: túnica mucosa (*) y la túnica muscular (**) del píloro.

3.2. Estudio comparativo, mediante análisis estadísticos, de la densidad de células IR frente a ghrelina en el píloro de ratones NOD y NOD/Scid.

Tras realizar el análisis estadístico en el que se ha comparado la densidad celular de los ratones NOD y NOD/Scid de 32 semanas se pudo concluir que no existen diferencias significativas entre la densidad celular de ambos grupos (Welch test, $p = 0.0927$, $p < 0.05$).

En este estudio los datos estadísticos se distribuían de manera normal, ya que en el Q-Q plot los valores no se alejan de la línea que superpone la función qqline con nuestros datos. Además, en el caso del test de Shapiro-Wilk, el p-value obtenido fue superior a 0.05 en ambos grupos (p-value (NOD/Scid) = 0.1552 ; p-value (NOD) = 0.6976), aceptando de esta manera la hipótesis nula que indica que la muestra sigue una distribución normal.

Asimismo, se analizaron las varianzas de las muestras, obteniendo un p-value en el test de varianzas inferior a 0.05 (p-value = 0.01022), de manera que se rechaza la hipótesis nula que indica que el ratio de varianzas es igual a uno.

Una vez se conoce la normalidad y la diferencia entre las varianzas de los datos se procedió a realizar un t-test ajustado en base a los datos obtenidos. El test de t-student de elección fue el test de Welch, en que se obtuvo un p-value bajo, aunque no por debajo del umbral estipulado (p-value = 0.0927, $p < 0.05$).

Como se puede observar en la imagen, existe una gran heterogeneidad entre los resultados obtenidos en los diferentes ratones de cada grupo de estudio (**Figura 11**).

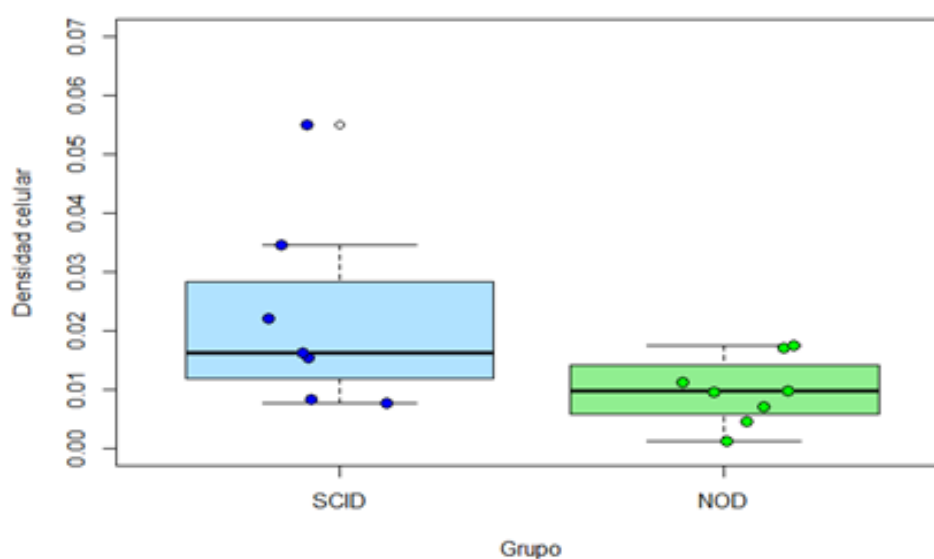


Figura 11. Bloxplot de la densidad de células IR para ghrelina en los grupos NOD y NOS/Scid de 32 semanas.

3.3. Estudio comparativo, mediante análisis estadísticos, de la densidad de células IR frente a ghrelina en el píloro de ratones NOD en función de la glucemia (NODN y NODH).

Los ratones NOD fueron divididos en dos subgrupos en función de los niveles de glucemia obtenidos por la Dra. Alcaraz. Una vez agrupadas las diferentes muestras, se compararon las densidades de células IR frente a ghrelina gracias a un estudio estadístico de carácter paramétrico donde no se observaron diferencias significativas entre las densidades celulares de los subgrupos NODN y NODH (t-student, p-value = 0.3987, $p < 0.05$) (**Figura 12**).

Al igual que en el anterior estudio, los datos estadísticos se distribuían de manera normal como mostraron los resultados obtenidos en el Q-Q plot y en el test de Shapiro-Wilk (p-value (NODH) = 0.3204 ; p-value (NODN) = 0.2893).

En cambio, a diferencia del estudio anterior, en el test de varianzas realizado en este estudio, el p-value obtenido fue superior a 0.05 (p-value = 0.9913) indicando que las varianzas son iguales. Además, en este caso, considerando que los datos del estudio siguen una normalidad y poseen varianzas iguales, se aplicó un test de t-student convencional en el que se obtuvo un p-value igual a 0.3987, por encima del valor por el cual se considera que existen diferencias entre las dos muestras a analizar ($p < 0.05$).

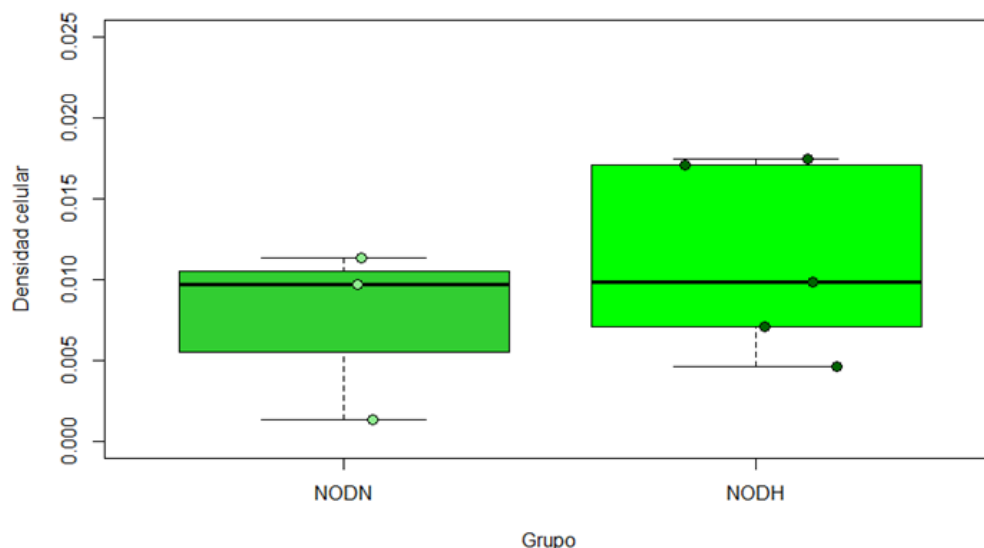


Figura 12. Bloxplot de la densidad de células IR frente a ghrelina de los dos subgrupos de ratones NOD.

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha estudiado la expresión de la ghrelina en el píloro de ratones NOD y NOD-Scid de 32 semanas de edad (modelo animal de DM1). En este estudio se ha observado una disminución no significativa en la densidad de células IR para ghrelina en la mucosa pilórica del grupo de los ratones NOD respecto al grupo NOD-Scid de 32 semanas (p -value = 0.0927). Este resultado corrobora los datos obtenidos en el estudio realizado por Rauma et al., en el que también se observó una disminución no significativa (p -value = 0.4) en el número de células IR para ghrelina en la mucosa oxíntica del estómago de ratones NOD de 22-24 semanas con respecto al grupo control (ratones BALB/cJ de la misma edad y sexo).

Asimismo, en otros estudios como el realizado por Masaoka et al. se observó que modelos animales de DM1 inducidos con STZ presentaban una disminución en el número de células IR para ghrelina, mientras que los niveles de este péptido en el plasma se encontraban aumentados. Estos resultados indicarían que las células productoras de ghrelina son capaces de liberar su contenido, quedándose de esta manera “vacías”, por lo que no sería posible detectar dichas células a través de técnicas IHQs. En este TFG no se pudo analizar los niveles de ghrelina en plasma, ya que no se disponía del plasma de los ratones.

Por otra parte, Rauma et al. también estudiaron la expresión de la ghrelina en ratones homocigotos ob/ob de 20 semanas. Estos ratones son la especie que más se utiliza como modelo animal para el estudio de la DM2. En este estudio, también se observó una disminución no significativa en la densidad de células IR para ghrelina del estómago en el grupo de los ratones ob/ob con respecto al grupo control (ratones de la misma especie, edad y sexo que no presentaban ni obesidad ni diabetes) ; (p -value = 0.16).

Parada Domínguez D. en cambio realizó un estudio con 61 muestras de pacientes en el que se estudió la expresión de ghrelina gástrica en pacientes con obesidad mórbida que habían sido intervenidos mediante gastrectomía vertical laparoscópica. De cada paciente se obtuvieron muestras del antro, cuerpo y fundus del estómago. En este estudio el 36.1% de los pacientes presentaba DM2, un 59% tenía hipertensión arterial sistémica y un 18% presentaba ambas patologías (48). En cuanto a los resultados, no se observaron diferencias significativas en la densidad de células IR para ghrelina en los pacientes diabéticos con respecto a los pacientes sanos (p = 0.81).

Por otra parte, estudios sobre la densidad de células IR para GLP-1 en modelos animales de DM1 presentan resultados dispares dependiendo de la edad del modelo animal empleado.

En la tesis realizada por la Dra. Alcaraz en 2012 se observó una mayor densidad de células IR para GLP-1 en el yeyuno de ratones NOD de 5 semanas, mientras que la densidad de células IR para GLP-1 en el yeyuno de ratones NOD de 20 semanas presentaban una disminución significativa con respecto al grupo control. Además, no se observó diferencias significativas en los ratones NOD de 32 semanas de edad.

Asurmendi M. también estudio el GLP-1 en ratones NOD, siendo estos de 8 semanas de edad. En su TFG observó una disminución significativa en la densidad de células IR para GLP-1 en los ratones NOD de 8 semanas con respecto a los NOD-Scid de la misma edad.

Asimismo, la Dra. Alcaraz también clasificó los ratones NOD en función de los valores de glucemia en sangre que poseían los ratones a lo largo del estudio. En este estudio, los ratones NOD hiperglucémicos (NODH) presentaban una disminución significativa en la densidad de células IR para GLP-1 en el yeyuno de ratones con respecto a los ratones NOD normoglucémicos (NODN). En este TFG también se ha observado una disminución, aunque no significativa, en la densidad de células IR para ghrelina de los ratones NODH con respecto a los NODN de 32 semanas ($p = 0.3987$).

Todos estos estudios apuntan a que a pesar de que la incretina GLP-1 actúe regulando positivamente la liberación de insulina en las células beta pancreáticas, la población IR para GLP-1 (al igual que las células IR para ghrelina que ejercen el efecto contrario) también sufre una disminución en los modelos animales de DM1.

Los resultados obtenidos en estos estudios se pueden explicar a que en un primer instante, cuando se está comenzando a desarrollar la patología, el organismo detecta que se está perdiendo masa celular beta pancreática. Como mecanismo de compensación, el organismo intentará compensar la pérdida aumentando la población de células IR para GLP-1, y por tanto, promover la supervivencia e incrementar la replicación de las células beta. Llegados a cierto punto, como consecuencia del avance de la patología, habrá una pérdida total de la masa celular beta que resultará en una disminución en la densidad de células IR para GLP-1 en el organismo. En el caso de la ghrelina, dado que posee un efecto inhibitorio sobre la secreción de insulina por parte de las células beta, a lo largo del avance de la patología el organismo sufrirá una disminución en la densidad de células IR para ghrelina impidiendo que ejerza su efecto insulinostático.

5. LIMITACIONES

A lo largo del trabajo han surgido diferentes complicaciones, siendo el principal problema la ausencia de la región de estudio en tres de los ratones.

En el estudio estadístico en el que se han comparado las densidades de células IR para ghrelina de la túnica mucosa de ratones NOD y NOD-Scid, el p-value obtenido fue un valor bajo ($p = 0.0927$), pero que no alcanzó el umbral ($p\text{-value} < 0.05$) por debajo del cual la diferencia de medias se considera una diferencia significativa. Por ello, creo que sería interesante seguir estudiando en experimentos futuros esta población celular para concluir definitivamente si existe una disminución significativa en el número de células IR para ghrelina en la mucosa del píloro de ratones NOD con una diabetes más avanzada. En dichos experimentos se deberían emplear un mayor número de muestras ya que de esta manera se obtendrían unos resultados más cercanos a los valores reales, pudiendo así contestar de manera precisa a la hipótesis planteada.

6. CONCLUSIONES

- 1) Se han observado células IR frente a ghrelina en la túnica mucosa del píloro, duodeno y yeyuno de ratones NOD y NOD/Scid de 32 semanas.
- 2) La densidad de células IR para la ghrelina en el píloro de los ratones NOD sufre una disminución no significativa frente a los ratones NOD-Scid de 32 semanas.
- 3) La densidad de células IR frente a ghrelina en el píloro de los ratones NOD hiperglucémicos (NODH) presenta una disminución no significativa con respecto a los valores obtenidos en el píloro de los ratones NOD normoglucémicos (NODN) de 32 semanas de edad.

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer al Dpto. de Patología, Anatomía y Fisiología de la universidad por permitirme realizar el TFG con ellos, en especial, a la Dra. M.^a Elena Bodegas Frías, por confiar en mí para realizar este proyecto, donde me ha ayudado y apoyado en todo momento. También quería agradecer a D. Javier García, técnico de laboratorio, por enseñarnos a realizar las técnicas pertinentes para el estudio y por su apoyo en el laboratorio.

7. ANEXOS

Anexo I. Protocolo de inmunohistoquímica de ghrelina (A-468)

Reactivos

- ✓ H₂O₂ comercial (peróxido de hidrógeno 33%, PANREAC 141077)
- ✓ TBS (Tris Buffer Saline) pH = 7.36 1X
- ✓ Suero normal de cabra dilución 1:20 (Dako Cytomation X0907)
- ✓ Antisuero primario (anti-ghrelina) de conejo, dilución 1:600 (Phoenix Pharmaceuticals Inc. N.º catálogo: H-031-30)
- ✓ Sistema de amplificación En Vision™ + glucosa-oxidasa
 - Polímero HRP comercial
 - Solución de revelado: glucosa oxidasa + DAB a partes iguales
- ✓ Tinción de contraste
 - Hematoxilina de Harris (Hematoxylin-Monohydrate, Merck 1159380025)
- ✓ Pegamento DPX (BDH Prolabo 360294H)

DÍA 1

- 1) Poner las preparaciones en la estufa a 60°C durante 30 minutos.
- 2) Poner las preparaciones en una cubeta con xilol durante 15 minutos. (*)
- 3) Trasladar las preparaciones a otra cubeta con xilol durante otros 15 minutos.
- 4) Hidratar las preparaciones introduciéndolas en cubetas con alcoholes de gradación decreciente (alcohol absoluto, 96°, 80°, 70°) para finalizar en agua del grifo. Deben permanecer 2 minutos en cada cubeta.
- 5) Poner los cortes en un koplín con una solución de bloqueo de la peroxidasa (5 mL H₂O₂ comercial diluida + 45 mL agua desionizada) en condiciones de oscuridad durante 10 minutos.
- 6) Poner las preparaciones en agua corriente durante 5 minutos.
- 7) Colocar las preparaciones en un koplín con TBS 1X durante 5 minutos.
- 8) Realizar la dilución del anticuerpo primario 1:600 en TBS.
- 9) Secar las preparaciones y colocarlas en la cámara húmeda.
- 10) Incubar las preparaciones en una gota de suero normal de cabra 1:20 durante 30 minutos.

11) Decantar el suero normal y añadir el anticuerpo primario dilución 1:600 durante una noche a 4°C en la cámara húmeda.

(*) En el caso de que la preparación no se esté desparafinando correctamente, tras los 15 minutos en la primera cubeta con xilol introduciremos esta misma cubeta con las preparaciones en la estufa durante otros 10 minutos. Posteriormente, trasladaremos las preparaciones a la siguiente cubeta de xilol reduciendo el tiempo a 10 minutos.

DÍA 2 ([Volver al texto](#))

- 1) Al día siguiente, sacar del frigorífico las preparaciones y dejar atemperar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 2) Lavar las preparaciones en TBS 1X durante 5 minutos.
- 3) Secar e incubar las preparaciones en dos gotas de antisuero secundario HRP anti-rabbit durante 30 minutos.
- 4) Secar y realizar un doble lavado en TBS 1X durante 5 minutos cada uno.
- 5) Secar e introducir las preparaciones en una solución de acético-acetato 1X (pH = 5.6) durante 5 minutos.
- 6) Preparar la solución de revelado de DAB/glucosa oxidasa a partes iguales.
- 7) Revelar las preparaciones con 50 µL de la solución DAB/glucosa oxidasa durante minuto y medio. Para parar la reacción se llevan las preparaciones a un koplín con agua corriente del grifo.
- 8) Lavar las preparaciones en agua corriente durante 5 minutos.
- 9) Secar y contrastar las preparaciones en hematoxilina de Harris durante 5 segundos.
- 10) Diferenciar la hematoxilina bajo agua corriente durante unos segundos.
- 11) Deshidratar las preparaciones llevándolas desde una cubeta con agua hasta un alcohol absoluto pasando por alcoholes de 96°, durante 2 minutos cada uno. La columna de deshidratación estaba formada por dos cubetas de alcohol 96° y dos de alcohol absoluto.
- 12) Llevar las preparaciones a las cubetas de xilol (2) durante 3 minutos cada uno.
- 13) Secar y colocar una gota de DPX sobre la preparación.
- 14) Colocar el cubreobjetos encima de la preparación asegurándose de que no queden burbujas en el interior.
- 15) Dejar secar las preparaciones al menos durante 20 minutos.

Anexo II. Protocolo de escaneo de muestras ([Volver al texto](#))

- 1) Encender la lámpara del escáner (Fiber-Lite DC950 Regulated Illuminator), el escáner (Aperio C2 Leica) y el ordenador.
- 2) Esperar a la autocalibración del escáner. Se indicará si el proceso está listo con una ventana que pone: “Scanner Ready”.
- 3) Abrir el software AperioScanScope-conect.
- 4) En la barra superior del programa aparecerán una serie de tareas, seguir los pasos: Tay → Snapshots → Yes.
- 5) Introducir el nombre de las preparaciones en el programa
- 6) Seleccionar el área de escaneo y los puntos de calibrado de la preparación
- 7) Seleccionar “Start”. Una vez comienza el escaneo aparece un código de colores:
 - a) Verde: El proceso se ha realizado correctamente.
 - b) Naranja: Ha habido algún tipo de fallo, analizar el fallo y si no se soluciona, volver al paso 4).
 - c) Rojo: Problema en el escaneo, volver al paso 4).
- 8) Guardar los archivos obtenidos en formato svz. o jpg. para su posterior análisis.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alam U, Asghar O, Azmi S, Malik RA. General aspects of diabetes mellitus. In: Handbook of Clinical Neurology. *Elsevier B.V.*; 2014. p. 211–22.
2. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*, 9th edn. Brussels, Belgium. Atlas de la Diabetes de la FID. 2019. 1–169 p.
3. Harding JL, Pavkov ME, Magliano DJ, Shaw JE, Gregg EW. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence. *Diabetologia*. 2019;62(1):3–16.
4. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37(SUPPL.1):81–90.
5. Vigil-De Gracia P, Olmedo J. Diabetes gestacional: Conceptos actuales. *Ginecol Obstet Mex*. 2017;85(6):380–90.
6. Metzger BE. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care*. 2010;33(3):676–82.
7. Carmen Carrillo APC. Genética de la diabetes mellitus. *Diabetes*. 2011 May 1;111(1):27–34.
8. Cristina Vega-Anaya G, Hernández-Lomelí A, Luis Hernández-Montiel H. Mecanismos de lesión inmunitaria en la diabetes mellitus tipo 1. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2009;47(5):515–22.
9. González Pérez de Villar, N. ; Pérez Pérez A. Etiopatogenia de la diabetes tipo 1 y procesos autoinmunitarios asociados . Evaluación inicial y programa de seguimiento. In: Experto en el manejo de la diabetes mellitus. *Editorial Médica Panamericana*; p. 1–19.
10. Imbuluzqueta I. Regeneración de las células beta de los islotes pancreáticos - Estudio en ratones NOD. 2010;(Tesis doctoral. Pamplona, Universidad de Navarra. Facultad de Ciencias):408.
11. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*. 2000;43(12):1528–33.

12. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Vol. 51, *Diabetologia*. 2008. p. 216–26.
13. Casado M. Animal models in diabetes research. Vol. 23, *Av Diabetol*. 2007.
14. Benavides FJ, Guénet J-L. Los roedores de laboratorio como modelos de enfermedades humanas. In: *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio (SECAL)*. 2003. p. 263–97.
15. Adorini L, Gregori S, Harrison LC. Understanding autoimmune diabetes: Insights from mouse models. Vol. 8, *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier; 2002. p. 31–8.
16. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999;402(6762):656–60.
17. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*. 2000;141(11):4255–61.
18. Hou Z, Miao Y, Gao L, Pan H, Zhu S. Ghrelin-containing neuron in cerebral cortex and hypothalamus linked with the DVC of brainstem in rat. *Regul Pept*. 2006 May 15;134(2–3):126–31.
19. Koutouratsas T, Kalli T, Karamanolis G, Gazouli M. Contribution of ghrelin to functional gastrointestinal disorders' pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2019;25(5):539–51.
20. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*. 2000 Oct 19;407(6806):908–13.
21. Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews ZB, Anker SD, Argente J, et al. Ghrelin. Vol. 4, *Molecular Metabolism*. Elsevier GmbH; 2015. p. 437–60.
22. Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, et al. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 29;105(17):6320–5.
23. Sato T, Nakamura Y, Shiimura Y, Ohgusu H, Kangawa K, Kojima M. Structure, regulation and function of ghrelin. *J Biochem*. 2012 Feb 1;151(2):119–28.

24. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: Structure and function. *Physiol Rev.* 2005;85(2):495–522.
25. Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi S, Fubini A, et al. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol.* 2002 Dec 23;159(6):1029–37.
26. Veldhuis JD, Bowers CY. Integrating GHS into the ghrelin system. Vol. 2010, *International Journal of Peptides.* Hindawi Publishing Corporation; 2010. p. 879503.
27. Sanger GJ, Broad J, Callaghan B, Furness JB. Ghrelin and motilin control systems in GI physiology and therapeutics. *Handb Exp Pharmacol.* 2017 Jan 1;239:379–416.
28. Andresen MC, Kunze DL. Nucleus tractus solitarius - Gateway to neural circulatory control. Vol. 56, Annual Review of Physiology. *Annual Reviews Inc.*; 1994. p. 93–116.
29. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(12):5992–5.
30. Briggs DI, Andrews ZB. Metabolic status regulates ghrelin function on energy homeostasis. *Neuroendocrinology.* 2011;93(1):48–57.
31. Inui A, Asakawa A, Y. Bowers C, Mantovani G, Laylano A, M. Meguid M, et al. Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *FASEB J.* 2004;18(3):439–56.
32. Napolitano T, Silvano S, Vieira A, Balaji S, Garrido-Utrilla A, Friano ME, et al. Role of ghrelin in pancreatic development and function. *Diabetes, Obes Metab.* 2018;20:3–10.
33. Dezaki K, Hosoda H, Kakei M, Hashiguchi S, Watanabe M, Kangawa K, et al. Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca²⁺ signaling in β -cells: Implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes.* 2004 Dec 1;53(12):3142–51.
34. Dezaki K, Kakei M, Yada T. Ghrelin uses Gai2 and activates voltage-dependent K⁺ channels to attenuate glucose-induced Ca²⁺ signaling and insulin release in islet β -cells: Novel signal transduction of ghrelin. *Diabetes.* 2007;56(9):2319–27.

35. Park S, Jiang H, Zhang H, Smith RG. Modification of ghrelin receptor signaling by somatostatin receptor-5 regulates insulin release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Nov 13;109(46):19003–8.
36. DiGruccio MR, Mawla AM, Donaldson CJ, Noguchi GM, Vaughan J, Cowing-Zitron C, et al. Comprehensive alpha, beta and delta cell transcriptomes reveal that ghrelin selectively activates delta cells and promotes somatostatin release from pancreatic islets. *Mol Metab*. 2016 Jul 1;5(7):449–58.
37. Alcaraz Ortega R. Estudio de la expresión de la hormona incretina GLP-1 en dos modelos animales de diabetes mellitus tipo 1 (ratones NOD y ratones BALB/c tratados con estreptozotocina). 2012;Tesis doct.
38. Farilla L, Hui H, Bertolotto C, Kang E, Bulotta A, Di Mario U, et al. Glucagon-Like Peptide-1 Promotes Islet Cell Growth and Inhibits Apoptosis in Zucker Diabetic Rats. *Endocrinology*. 2002 Nov 1;143(11):4397–408.
39. Turton MD, O’Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CMB, Meeran K, et al. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*. 1996 Jan 4;379(6560):69–72.
40. Baggio LL, Huang Q, Brown TJ, Drucker DJ. A recombinant human glucagon-like peptide (GLP)-1-albumin protein (Albugon) mimics peptidergic activation of GLP-1 receptor-dependent pathways coupled with satiety, gastrointestinal motility, and glucose homeostasis. *Diabetes*. 2004 Sep 1;53(9):2492–500.
41. Leech CA, Dzhura I, Chepurny OG, Kang G, Schwede F, Genieser HG, et al. Molecular physiology of glucagon-like peptide-1 insulin secretagogue action in pancreatic β cells. Vol. 107, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. Pergamon; 2011. p. 236–47.
42. MacDonald PE, El-kholy W, Riedel MJ, Salapatek AMF, Light PE, Wheeler MB. The multiple actions of GLP-1 on the process of glucose-stimulated insulin secretion. *In: Diabetes*. American Diabetes Association Inc.; 2002. p. S434–42.
43. Light PE, Manning Fox JE, Riedel MJ, Wheeler MB. Glucagon-like peptide-1 inhibits pancreatic ATP-sensitive potassium channels via a protein kinase A- and ADP-dependent mechanism. *Mol Endocrinol*. 2002 Sep 1;16(9):2135–44.

44. Rauma J, Spångéus A, El-Salhy M. Ghrelin cell density in the gastrointestinal tracts of animal models of human diabetes. *Histol Histopathol.* 2006;21(1–3):1–5.
45. Masaoka T, Suzuki H, Hosoda H, Ota T, Minegishi Y, Nagata H, et al. Enhanced plasma ghrelin levels in rats with streptozotocin-induced diabetes. *FEBS Lett.* 2003;541(1–3):64–8.
46. Asurmendi Senosiain M. Estudio de la expresión de GLP-1 en yeyuno de ratones NOD y NOD/Scid de 8 semanas de vida. 2018;1–24.
47. Prochazka M, Gaskins HR, Shultz LD, Leiter EH. The nonobese diabetic scid mouse: Model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(8):3290–4.
48. Parada Domínguez D. Inmunohistoquímica en pacientes con obesidad mórbida intervenidas mediante gastrectomía vertical laparoscópica , y su relación con las variaciones plasmáticas de ambas isoformas de grelina. 2018;(Doctoral dissertation, Universitat Rovira i Virgili).