

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA Y EMBRIOLOGÍA HUMANA



**UCA**

---

Universidad  
de Cádiz

## TESIS DOCTORAL

UN NUEVO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN  
DEL YEYUNO E ÍLEON EN LA CIRUGÍA BARIÁTRICA: LA  
TRANSPOSICIÓN ILEAL PREPILÓRICA

JESÚS MARÍA SALAS ÁLVAREZ  
CÁDIZ, JULIO 2022



UNIVERSIDAD  
DE CÁDIZ

Dr. D. José Arturo Prada Oliveira y Dr. D. Alonso Camacho Ramírez, en calidad de co-directores de la Tesis doctoral realizada por D. Jesús Salas Álvarez, titulada “Un nuevo modelo para el estudio de la implicación del yeyuno e íleon en la cirugía bariátrica: la transposición ileal prepilórica.”

**DECLARAN EXPRESAMENTE:**

Que los resultados contenidos en dicha tesis doctoral se adecuan en su totalidad a los trabajos de investigación realizados durante el periodo de investigación y desarrollo de la misma, así mismo recogidos en el proyecto de tesis doctoral presentado previamente. Que dichos resultados cumplen los requisitos de objetividad, originalidad, validez y relevancia solicitados para su presentación y defensa como Tesis Doctoral, y que el Doctorando ha cumplido todos los requerimientos formativos durante el desarrollo de la tesis doctoral. Para que conste a los efectos oportunos lo firmamos en Cádiz, a 14 de julio de 2022.

Fdo.: J.A. Prada Oliveira

Fdo.: Alonso Camacho Ramírez



## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento inicialmente a los directores de tesis, el Dr. Arturo Prada Oliveira, que con su amplia experiencia universitaria ha sabido dirigir, animar e incluso exigir de forma adecuada para que el trabajo llegara a término. Al Dr. Alonso Camacho Ramírez, con quien compartí horas de quirófano en mi preparación como cirujano y de quien podré seguir aprendiendo en el noble arte de la cirugía. Y, por último, pero no por ello menos importante, al Dr. Gonzalo Pérez-Arana, quien de facto ha sido un director más, brindando su gran apoyo en el trabajo de laboratorio, al microscopio y en el análisis estadístico.

En la esfera personal me gustaría hacer mención de mi amigo y compañero, el ya doctor Francisco Javier Campos Martínez, quien desde que llegó al hospital fue estímulo para el aprendizaje y la superación, trabajando codo con codo en el quirófano y laboratorio a partes iguales, logrando crear el vínculo de complicidad necesario en tan arduo camino.

No quiero olvidarme del resto de profesionales docentes con cuya ilusión y vocación lograron despertar en mí el amor a la Ciencia desde los inicios de mi vida académica.

De forma particular me gustaría recordar lo importante que ha sido mi familia durante estos años. Ellos son el gran apoyo que he podido encontrar cuando tropezaba. Mi hermana María, que con su entrega y dedicación profesional es un ejemplo diario de vocación sanitaria. A mis padres, Jesús y Pilar, por el amor incondicional, la educación y el aliento que nos regalan. A mis abuelos, tanto aquí como en el Cielo, parte fundamental de mi crianza.

A mi pareja y compañero de vida Manuel, quien con una sonrisa derriba los miedos y de forma paciente ha sabido escuchar mis dudas, aconsejar sabiamente y respetar mis decisiones.

A todos ellos, y por haber confiado en mí cuando ni yo mismo lo hacía; gracias



# **ÍNDICE**





<b>GLOSARIO DE ACRÓNIMOS.....</b>	<b>15</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>1. <u>El páncreas y el tubo digestivo. Embriología, anatomía, histología y fisiología.....</u></b>	<b>29</b>
<b>1.1. <u>Embriología y anatomía del páncreas humano y del roedor..</u></b>	<b>29</b>
<b>1.2. <u>Histología y fisiología del páncreas humano y del roedor.....</u></b>	<b>32</b>
<b>1.2.1. <u>Arquitectura histológica y distribución de los islotes...</u></b>	<b>32</b>
<b>1.2.2. <u>¿Quién es quién en el islote?.....</u></b>	<b>33</b>
<b>1.3. <u>Anatomía, histología y fisiología del aparato digestivo adyacente.....</u></b>	<b>37</b>
<b>1.3.1. <u>El estómago.....</u></b>	<b>38</b>
<b>1.3.2. <u>El intestino delgado.....</u></b>	<b>39</b>
<b>1.4. <u>La regulación fisiológica de la glucemia.....</u></b>	<b>40</b>
<b>2. <u>Los mecanismos homeostáticos dentro del páncreas endocrino...43</u></b>	<b>43</b>
<b>2.1. <u>Apoptosis o muerte celular programada.....</u></b>	<b>43</b>
<b>2.2. <u>Hiperplasia / hipertrofia.....</u></b>	<b>44</b>
<b>2.3. <u>Proliferación.....</u></b>	<b>44</b>
<b>2.4. <u>Neogénesis (diferenciación y transdiferenciación celular)...45</u></b>	<b>45</b>
<b>3. <u>La Diabetes Mellitus 1, la Diabetes Mellitus 2 y otros tipos de diabetes.....</u></b>	<b>48</b>
<b>3.1. <u>La Diabetes Mellitus tipo 1.....</u></b>	<b>48</b>
<b>3.2. <u>La Diabetes Mellitus tipo 2.....</u></b>	<b>48</b>
<b>3.3. <u>La Diabetes Mellitus tipo LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults).....</u></b>	<b>49</b>
<b>3.4. <u>La Diabetes Mellitus tipo MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young).....</u></b>	<b>50</b>
<b>3.5. <u>Mecanismos patogénicos en la DM2.....</u></b>	<b>50</b>
<b>3.5.1. <u>Resistencia insulínica.....</u></b>	<b>50</b>
<b>3.5.2. <u>Autoinmunidad e inflamación.....</u></b>	<b>52</b>
<b>3.5.3. <u>El péptido amilode (amilina).....</u></b>	<b>53</b>

3.5.4.	<b><u>Las adipocinas.....</u></b>	<b><u>53</u></b>
4.	<b><u>Incretinas y cirugía.....</u></b>	<b><u>56</u></b>
4.1.	<b><u>Incretinas y su implicación en el metabolismo de la glucosa..</u></b>	<b><u>56</u></b>
4.2.	<b><u>La cirugía bariátrico/metabólica.....</u></b>	<b><u>57</u></b>
4.2.1.	<b><u>Técnicas restrictivas puras.....</u></b>	<b><u>58</u></b>
4.2.2.	<b><u>Técnicas malabsortivas puras.....</u></b>	<b><u>59</u></b>
4.2.3.	<b><u>Técnicas mixtas.....</u></b>	<b><u>61</u></b>
4.3.	<b><u>Bases teóricas de la cirugía bariátrico/metabólica.....</u></b>	<b><u>61</u></b>
4.3.1.	<b><u>Hipótesis del intestino proximal.....</u></b>	<b><u>62</u></b>
4.3.2.	<b><u>Hipótesis del intestino distal.....</u></b>	<b><u>63</u></b>
4.3.3.	<b><u>Hipótesis de la microbiota.....</u></b>	<b><u>64</u></b>
	<b><u>Capítulo 2. Hipótesis y objetivos.....</u></b>	<b><u>67</u></b>
1.	<b><u>Hipótesis.....</u></b>	<b><u>69</u></b>
1.1.	<b><u>Hipótesis conceptual.....</u></b>	<b><u>69</u></b>
1.2.	<b><u>Hipótesis operativa.....</u></b>	<b><u>69</u></b>
2.	<b><u>Objetivos.....</u></b>	<b><u>69</u></b>
2.1.	<b><u>Objetivo general.....</u></b>	<b><u>69</u></b>
2.2.	<b><u>Objetivos específicos.....</u></b>	<b><u>70</u></b>
	<b><u>Capítulo 3. Materiales y métodos.....</u></b>	<b><u>72</u></b>
1.	<b><u>Animales de experimentación.....</u></b>	<b><u>74</u></b>
2.	<b><u>Materiales.....</u></b>	<b><u>75</u></b>
2.1.	<b><u>Materiales empleados durante la intervención quirúrgica y para el seguimiento funcional fenotípico de los animales.....</u></b>	<b><u>75</u></b>
2.2.	<b><u>Materiales para la fijación de las muestras biológicas y procesado histológico previo a los estudios inmunohistoquímicos.....</u></b>	<b><u>75</u></b>
2.3.	<b><u>Materiales para los estudios inmunohistoquímicos: estudio de la masa beta, alfa, proliferación y transcripción.....</u></b>	<b><u>76</u></b>
3.	<b><u>Métodos experimentales.....</u></b>	<b><u>77</u></b>
3.1.	<b><u>Grupos de estudio.....</u></b>	<b><u>77</u></b>
3.2.	<b><u>Técnica quirúrgica.....</u></b>	<b><u>79</u></b>
3.2.1.	<b><u>Grupo sham.....</u></b>	<b><u>80</u></b>

3.2.2. Grupo quirúrgico: Transposición Ileal Preduodenal (PDIT).....	80
4. Determinaciones funcionales.....	83
4.1. Ingesta e incremento de peso.....	83
4.2. Determinación de la glucemia basal.....	84
4.3. Test de sobrecarga oral de glucosa.....	84
4.4. Sacrificio y preparación de las muestras.....	85
5. Determinaciones tras el sacrificio.....	86
5.1. Estudio de la masa celular beta y área media de islotes.....	86
5.2. Estudio de proliferación en población beta.....	87
5.3. Estudio de neogénesis en población beta (transcripción beta).....	88
5.4. Estudio de masa celular alfa.....	89
5.5. Estudio de proliferación en población alfa.....	90
5.6. Estudio de neogénesis en población alfa (transcripción alfa).....	91
6. Análisis de los datos y tratamiento estadístico de los mismos.....	92.
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....</b>	<b>94</b>
1. Estudio funcional.....	97
1.1. Estudio de la evolución ponderal.....	97
1.2. Estudio de la glucemia basal.....	98
1.3. Estudio de la glucemia tras test de tolerancia oral a glucosa.....	99
1.4. Estudio de insulinemia.....	100
2. Estudio histomorfométrico.....	102
2.1. Área media de islotes.....	102
3. Estudio de población beta.....	103
3.1. Estudio de la masa beta pancreática.....	103
3.2. Estudio de proliferación.....	104
3.3. Estudio de neogénesis.....	104
4. Estudio de población alfa.....	105
4.1. Estudio de la masa alfa pancreática.....	106

4.2. Estudio de neogénesis.....	107
4.3. Estudio de proliferación.....	107
<b>CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>110</b>
1. <b>Sobre la expresión fenotípica. Comportamiento ponderal y de glucemias basales en nuestro modelo.....</b>	<b>114</b>
2. <b>Sobre los hallazgos en pruebas funcionales. Respuesta a la prueba de sobrecarga oral de glucosa y cifras de insulinemia.....</b>	<b>116</b>
3. <b>Sobre los cambios histomorfológicos en el páncreas endocrino...120</b>	<b>120</b>
<b>CÁPITULO 6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>132</b>
<b>CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>136</b>
<b>CAPÍTULO 8. ACTIVIDAD CIENTÍFICA.....</b>	<b>164</b>



## **GLOSARIO DE ACRÓNIMOS**





Hnf1b: Factor nuclear del hepatocito 1 beta  
Hnf6: Factor nuclear del hepatocito 6  
Prox1: Prospero homeobox 1  
Pdx-1: Pancreatic and duodenal homeobox 1  
Ngn3: Neurogenina 3  
PP: Polipéptido pancreático (pancreatic polypeptide)  
μm: micrómetro  
ATP: Trifosfato de adenosina  
IDF-1: Factor de crecimiento insulínico 1  
nm: nanómetro  
Gcgr: Receptor de glucagon  
AMPC: Monofosfato de adenosina cíclico  
GLP-1: Péptido similar al glucagon 1 (glucagon-like peptide 1)  
GLP-2: Péptido similar al glucagon 2 (glucagon-like peptide 2)  
GIP: Polipéptido inhibidor gástrico (gastric inhibitory polypeptide)  
PYY: Péptido Y  
GLUT: Transportador de glucosa  
IRS1: Sustrato receptor de insulina 1 (insuline receptor substrate 1)  
IRS2: Sustrato receptor de insulina 2 (insuline receptor substrate 2)  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
PTHrP: Proteína relacionada con la hormona paratiroidea  
HGF: Factor de crecimiento hepatocitario  
IGF-1: Factor de crecimiento insulínico 1  
MAPK: Mitogen-activated protein kinases  
AKT/PI3K: Fosfatidilinositol 3 kinasa (phosphatidylinositol 3-kinase)  
Arx: Aristaless-related homeobox  
Pax: Paired box  
Dnmt1: ADN-metiltransferasa 1 (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1)  
Nkx2.2: NK2 homeobox 2  
MODY: Diabetes de la edad madura que se presenta en el joven (maturity onset diabetes of the young)

LADA: Diabetes autoinmunitaria latente del adulto (latent autoimmune diabetes in adults)

ADA: American diabetes association

mg: Miligramos

dl: Decilitros

DM1: Diabetes mellitus tipo 1

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

GAD65: Glutamato descarboxilasa 65

IMC: Índice de masa corporal

FATP-5: Human fatty acid transport protein 5

PKC –  $\epsilon$ : Proteína quinasa C tipo épsilon (Protein kinase C epsilon type)

IPF-1: Factor promotor de insulina 1 (insuline promoter factor 1)

FGF21: Factor de crecimiento de fibroblastos (fibroblast growth factor)

DPPIV: Dipeptidil peptidase 4 (dipeptidyl peptidase 4)

IFSO: International federation for the surgery of obesity and metabolic disorders

Kg: Kilogramo

m<sup>2</sup>: Metro cuadrado

BGA: banda gástrica ajustable

SG: Gastrectomía vertical

*DBP: Derivación biliopancreática*

*CD: Cruce duodenal*

*RYGB: Bypass gástrico*

cm: Centímetro

PDIT: Transposición ileal preduodenal

SEPA: Servicio de experimentación y producción animal

UCA: Universidad de Cádiz

STF: Suero ternera fetal

DABCO: Trietilendiamina

DAPI: 4'-6' diamino-2-fenil indol

DAB: Diaminobencidina

PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación (proliferating cell nuclear antigen)

IgG: Inmunoglobulina G

V/V: Volumen/volumen

PBS: Tampón fosfato salino

G: Gramo

SOG: Sobrecarga oral de glucosa

BPM: Bajo peso molecular

P/V: Peso/volumen

°C: Grados Celsius

mm<sup>2</sup>: Milímetro cuadrado

min: Minuto

h: Hora

EEM: Error estándar de la media

AUC: Área bajo la curva

pg: Picogramo

n°: Número

IT: Transposición ileal postduodenal

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay)

DNMT3a: ADN-metiltransferasa 3A (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A)

HDAC1: Histona deacetilasa 1 (histone deacetylase 1)



## **JUSTIFICACIÓN**



La obesidad a lo largo del siglo XX se ha convertido en una verdadera pandemia, casi duplicando sus cifras de prevalencia. Las estimaciones para el 2030 consideran que hasta la mitad de la población de los EE. UU. será obesa. Los principales factores de riesgo son un estilo de vida sedentario y alta ingesta calórica, comunes los dos en nuestro entorno socioeconómico. La obesidad está relacionada con diversas patologías secundarias, como la hipertensión, dislipemia y diabetes mellitus tipo 2.

Desde antaño se han invertido grandes esfuerzos en identificar la mejor estrategia para paliar esta enfermedad. Inicialmente la mayoría se basan en la promoción de campañas de prevención primaria que, si bien son las más eficientes, demuestran escasa penetración en los estratos menos favorecidos de la sociedad.

A lo largo de los años, el desarrollo de la cirugía bariátrica ha demostrado ser el esquema más efectivo y eficaz en el control ponderal, y lo que es de mayor interés para nuestro trabajo, en las comorbilidades asociadas; en especial la diabetes mellitus tipo 2.

Dicha mejoría en el metabolismo hidrocarbonado de los pacientes diabéticos en el contexto de la obesidad se presenta de forma consistente y lo que es más sorprendente, prácticamente de forma inmediata tras la intervención quirúrgica.

El porqué de estos hallazgos ha demostrado el interés de numerosos equipos de investigación a lo largo de las últimas décadas, poniendo el foco en el importante rol que desempeña el intestino delgado, y las enterohormonas que en él se segregan.

Dichos factores estarían en relación con un eje enteropancreático que redundaría en una serie de cambios histomorfológicos en el páncreas endocrino.

Existen varias teorías vigentes hoy en día, como la implicación de la microbiota, o la localización anatómica del segmento de intestino delgado, ya que la secreción de diversas hormonas se encuentra diferenciada a lo largo del mismo. De este modo encontramos la teoría del intestino proximal (foregut theory), que se basa en la ausencia de secreción a nivel duodenal de un factor con papel inhibidor de las incretinas (factor anti-incretínico), secundaria a la exclusión duodenal en ciertas técnicas bariátricas. Esta teoría ha fracasado en la identificación de dicho factor, que siendo la piedra angular en la que se basa obliga a continuar desarrollando estudios en este sentido. La otra teoría digna de mención es la llamada teoría del intestino distal (hindgut theory), cuyo actor principal es el íleon, con la secreción de incretinas que en él se da, las cuales tienen un claro efecto estimulador sobre el páncreas endocrino.

Ambas teorías no han de ser obligatoriamente excluyentes, sin embargo, hasta ahora, las técnicas más comúnmente desarrolladas en la práctica clínica sí implican la exclusión de los segmentos proximales del intestino, por lo tanto, se sesga la extracción de conclusiones.

Por este motivo, nuestro equipo de investigación en este trabajo propone una técnica quirúrgica experimental basada en la transposición ileal a una localización preduodenal, lo cual permite estudiar el efecto en el páncreas asociado al estímulo más precoz posible del íleon, sin excluir el paso a través del duodeno y yeyuno.

Nuestro estudio se encuentra más que justificado dado que este campo de la cirugía tiene un futuro brillante, tanto por el aumento de la población obesa que se espera en los próximos años, así como las amplias lagunas de conocimiento que incluso a día de hoy persisten en cuanto a los mecanismos fisiológicos implicados en la mejoría e incluso curación de la diabetes mellitus tipo 2 asociada a la obesidad.





**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUCCIÓN**





## **1. El páncreas y el tubo digestivo. Embriología, anatomía, histología y fisiología**

### **1.1. Embriología y anatomía del páncreas humano y de roedor**

El páncreas es un órgano retroperitoneal, con forma de hoja de pequeño tamaño en comparación al resto de los órganos de la cavidad abdominal.

Originariamente se desarrolla a partir del endodermo desde dos brotes intestinales separados, uno dorsal y otro ventral. Entre la cuarta y la quinta semana de gestación, el brote dorsal, que originará la cabeza y el proceso uncinado, se dirige hacia posterior para fusionarse con el ventral; que será el origen del resto de la glándula (1). En la diferenciación a partir del endodermo juegan un importante papel una serie de factores de transcripción como Hnf1b, Hnf6, Prox1, y particularmente Pdx-1 y Neurogenina-3 (Ngn3) como responsables de la diferenciación hacia las líneas celulares propias del páncreas endocrino (2).

Desde el punto de vista anatómico, el páncreas humano se divide en cabeza, cuerpo y cola. La cabeza se encuentra en íntimo contacto y medial a la curvatura del duodeno. El cuerpo y la cola se encuentran posteriores al estómago en dirección hacia el bazo. Los jugos pancreáticos necesarios para la función exocrina se drenan en la segunda porción duodenal a través de dos conductos: Wirsung, el principal, y Santorini el secundario que rinden en la ampolla de Vater (3).

La vascularización del páncreas humano depende de ramas del tronco celíaco y de la arteria mesentérica superior. Éstas a la vez se subdividen en distintas

arterias de menor calibre y arteriolas, que dan capilares fenestrados que suministran sangre arterial a los islotes pancreáticos.

En cuanto a la inervación; es vegetativa, simpática y parasimpática. Las fibras

parasimpáticas se originan en el núcleo motor dorsal del nervio vago, situado en el tronco del encéfalo. La primera neurona realiza la sinapsis ganglionar con la segunda neurona, que será la que realice el efecto necesario. Estos ganglios se disponen intrapancreáticos y están en relación con el plexo celíaco. El neurotransmisor implicado en esta vía es la acetilcolina, y de ella dependerá la modulación de las hormonas peptídicas. La vía simpática, sin embargo, depende de los nervios espláncnicos mayores, cuya segunda neurona se encuentra en los ganglios paravertebrales (3).

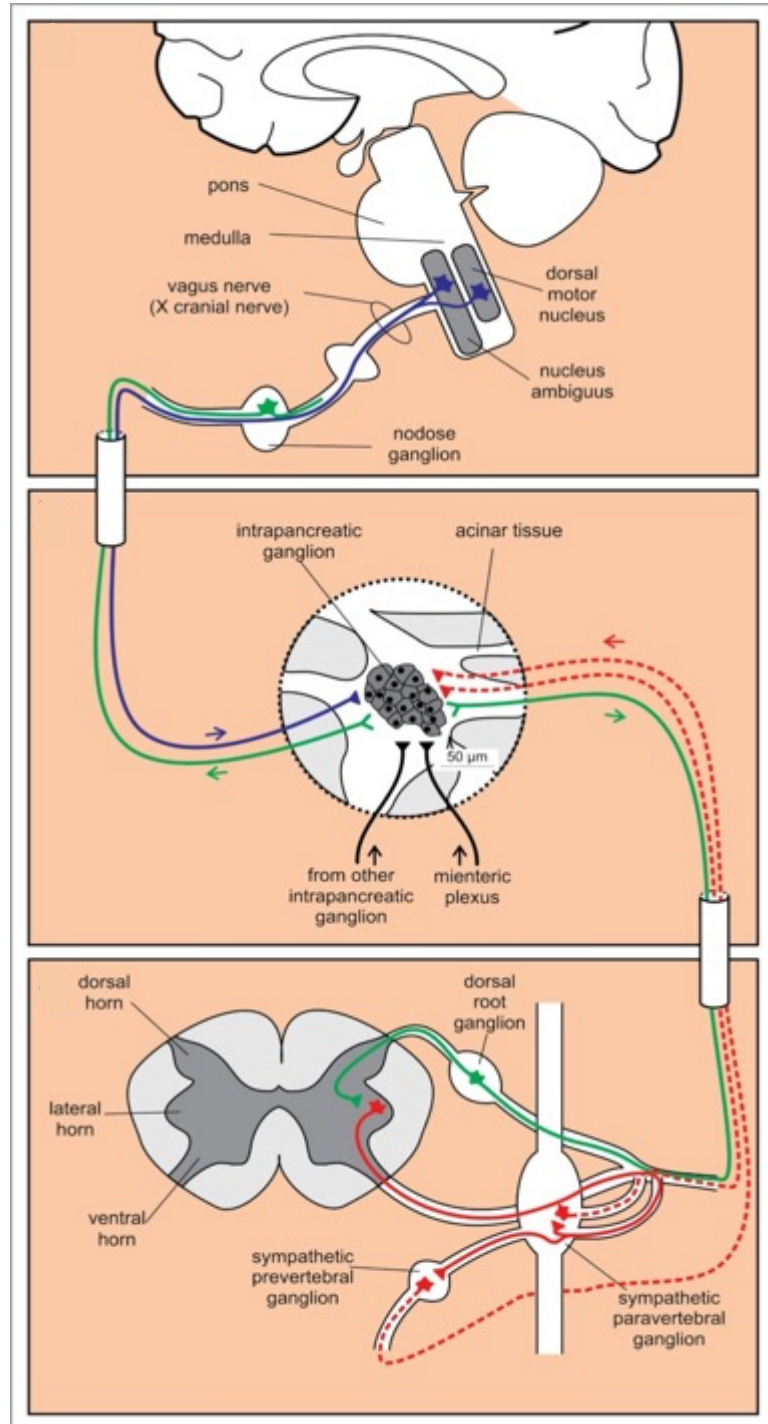


Figura 1. Inervación simpática y parasimpática del islote pancreático (3).

Dentro del islote pancreático, las fibras, tanto simpáticas como parasimpáticas, se disponen paralelas a las arteriolas del islote.

Así, existe un eje neurovascular que contiene arteriolas y fibras simpáticas y parasimpáticas, que constituye el centro del islote alrededor del cual, en el caso de los roedores, se localizarán las células beta. Estas arteriolas van a dar lugar a capilares que se ramificarán en el medio extracelular hacia la periferia del islote, irrigando las células localizadas en este territorio (4).

El páncreas de la rata presenta diferencias con respecto al humano. De este modo, se trata de un

páncreas lobulado, más difuso y fino. Se extiende a través de una membrana que lo limita anteriormente con la cavidad

abdominal. Sus relaciones anatómicas son similares a las del humano, con la curvatura duodenal en su vertiente medial y la

cara posterior del estómago en toda su

extensión. Presenta una estructura muy laxa y friable y su coloración es amarilla, por lo que es muy difícil de identificar de la grasa circundante. A diferencia del páncreas humano, el de la rata cuenta con diferentes estructuras ductales que confluyen en el conducto biliar común (3).

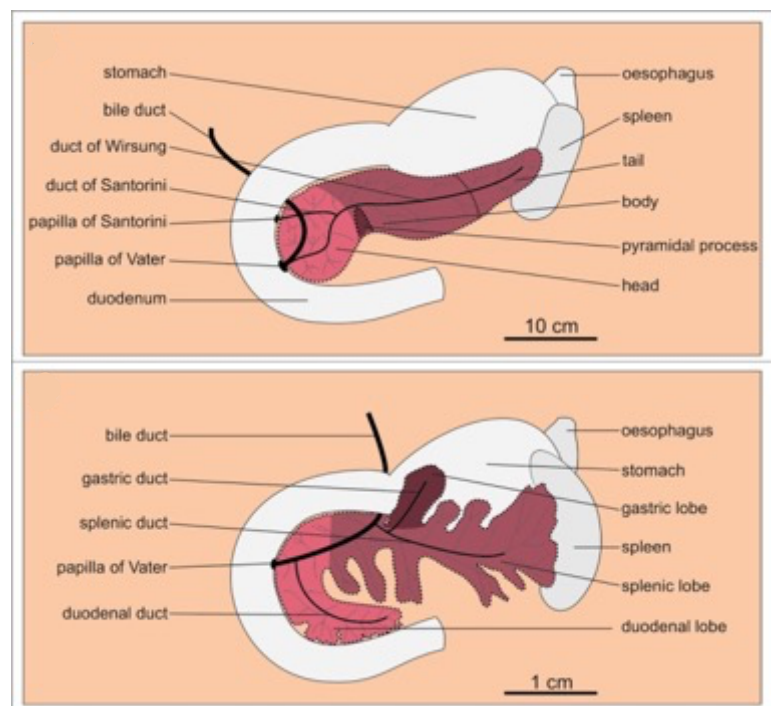


Figura 2. Diferencias anatómicas entre el páncreas humano y el de la rata (3).

## 1.2. Histología y fisiología del páncreas humano y de roedor

El páncreas presenta una doble vertiente fisiológica: la función exocrina y la endocrina. La función primera es la encargada de facilitar la digestión de los alimentos a través de la secreción de enzimas pancreáticas y bicarbonato a la luz intestinal, mientras que la endocrina es llevada a cabo por la unidad funcional - el islote pancreático - que vierte su producción al torrente sanguíneo (5).

### 1.2.1. Arquitectura histológica y distribución de los islotes

El páncreas endocrino constituye menos del 2% del total del peso de la glándula. Su unidad funcional son los islotes de Langerhans. El término islote pancreático, o de Langerhans, define un acumulo de células de tamaño variable y cierta complejidad donde coexisten distintos tipos celulares de linaje endocrino. Se

diferencian células alfa ( $\alpha$ ), productoras de glucagón; beta ( $\beta$ ), productoras de insulina; épsilon ( $\epsilon$ ), productoras de ghrelina; delta ( $\delta$ ), productoras de somatostatina y células productoras de polipéptido pancreático (PP) (6).

En el humano, la distribución de los

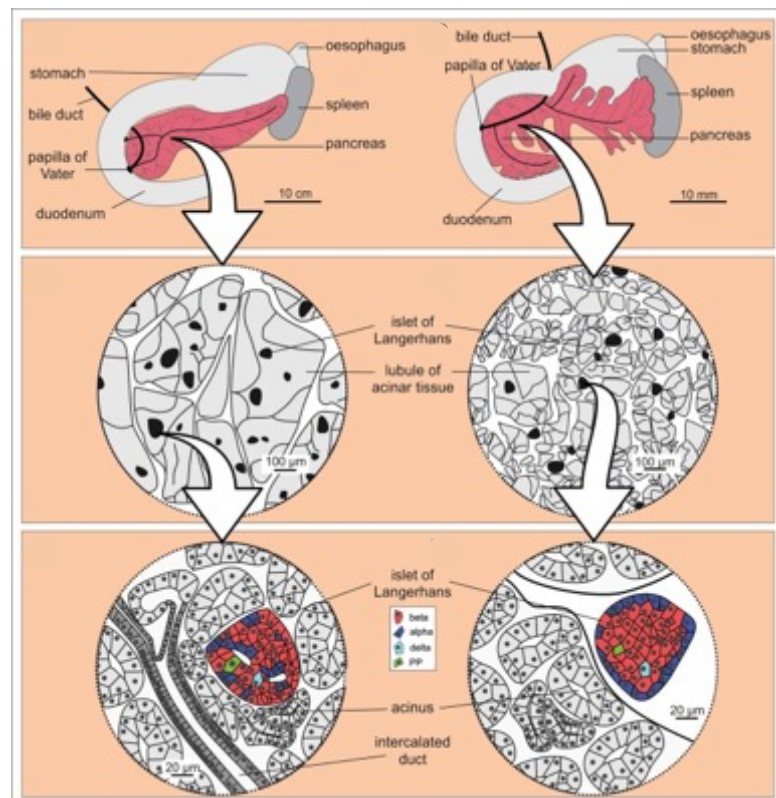


Figura 3. Distribución celular en el islote pancreático del humano y de la rata (3).



islotos es homogénea a lo largo de todo el órgano estando en mayor proporción cerca de los vasos (7). Las células se encuentran rodeadas de una cápsula de tejido conectivo, rica en fibroblastos y colágeno, que los delimita en su periferia. El tamaño de los islotes varía entre los 40 y 400  $\mu\text{m}$  de diámetro. La distribución de las células beta en el islote es homogénea y constituyen el 80-90% de las células.

En las ratas, y a diferencia del humano, la distribución de los islotes es irregular, siendo mayor en la cabeza, donde se encuentran además los islotes de mayor tamaño. Dentro del islote, las células beta se distribuyen en el centro de este, y suponen el 60-80% de todas las células (3).

### 1.2.2. ¿Quién es quién en el islote?

#### *Células beta ( $\beta$ ):*

Son las productoras de insulina y conforman aproximadamente el 60-80% en roedores, 50-70% en humanos de cada islote (3). El peso de la masa de células beta es mayor durante la embriogénesis e infancia. Este periodo de crecimiento viene dado por factores nutricionales, ambientales y genéticos. La determinación del tamaño es compleja debido a que la masa beta es dinámica, presentando cambios en tamaño y actividad a lo largo de la vida del individuo para mantener una correcta homeostasis glucídica (9).

Una glucemia elevada estimula la secreción de insulina por parte de estas células como veremos más adelante. Recordemos, como dijimos antes, que la distribución varía en función de la especie, de tal modo que, en el caso de los roedores, las células beta se localizan en el centro del islote, rodeadas por células alfa, épsilon, delta y PP (3), mientras que en el caso de los humanos la distribución de los tipos celulares es aleatoria sin un patrón definido (3).

- Insulina:

La insulina es un péptido de 51 aminoácidos organizados en dos cadenas A y B unidas por dos puentes disulfuro y sintetizada en forma de preproinsulina en el retículo endoplásmico rugoso, donde es transformada en proinsulina. Ésta se procesa y almacena en el aparato de Golgi en gránulos secretores cerca de la membrana plasmática y dará lugar a cantidades equimolares de insulina y de péptido C (10).

Los principales factores que estimulan su secreción son la presencia de glucosa plasmática, algunos aminoácidos como alanina, glicina o arginina o la acetilcolina liberada por terminales parasimpáticos (11, 12). Así, las proteínas de membrana de la familia GLUT incorporan glucosa al interior de celular. Éstas son un grupo de hasta catorce proteínas transportadoras codificadas por el gen SLC2, aunque si bien es cierto las cinco primeras (GLUT 1 – 5) son las más estudiadas (13). La glucosa durante su proceso de oxidación genera niveles altos de ATP que permiten la apertura de los canales de  $K^+$  ATP dependientes, lo que lleva a la despolarización de la membrana plasmática y la apertura de canales de  $Ca^{++}$  voltaje dependientes con un aumento de  $Ca^{++}$  intracelular, que termina provocando la exocitosis de los gránulos continentales de insulina (14).

Su acción se ejerce sobre la totalidad de las células del organismo a través de la unión a sus receptores específicos Insulin Receptor Substrate (IRS1 y 2). Estas proteínas transmiten la señal de los receptores de insulina e IDF-1 para obtener una respuesta celular (15).

#### *Células alfa ( $\alpha$ ):*

Las células alfa son el segundo tipo celular en abundancia dentro del islote. En el caso del humano representan un 35-40% mientras que en los roedores supone un 15% del total del islote. Al igual que las células beta, en el humano

la distribución dentro del islote es irregular. En el caso de las ratas, la localización sí está mucho más organizada en la periferia del islote y más concentradas en la cola del páncreas (3). Lo que sí se repite tanto en los roedores como en los humanos es que, en ambos casos, las células alfa se encuentran adyacentes al capilar y en íntimo contacto con las células beta, permitiendo que las señales paracrinas regulen localmente un sistema de autorregulación glucosensitivo mediante un equilibrio exquisito entre insulina y glucagón (16).

- Glucagón:

Péptido de 29 aminoácidos descubierto en 1923 por Murlin et al (17). Se sintetiza en forma de preproglucagón y posteriormente por un mecanismo proteolítico da lugar al glucagón u otra serie de péptidos como oxintomodulina o Glucagon Like Peptide 1 y 2 (GLP-1 y 2) (16). Éste, al igual que la insulina, se almacena en el citoplasma de las células alfa en forma de gránulos. Estos gránulos de glucagón son grandes y densos, de un diámetro algo menor que aquellos que secretan insulina (200 versus 350 nm). Su secreción es estimulada por niveles bajos de glucosa plasmática o por la presencia de aminoácidos. Así mismo es inhibida por la presencia de niveles altos de insulina.

Tiene actividad hiperglucemiante al unirse a sus receptores (Gcgr) (18); que, aunque mayoritariamente se expresan en el hígado, de manera extrahepática se pueden encontrar trazas en otros tejidos como el renal, suprarrenal, esplénico, linfoblásticos o pancreático entre otros (18). Esta interacción lleva a un incremento de AMPc en los hepatocitos y provoca una cascada de reacciones que terminan por activar enzimas como la glucosa 6 fosfatasa, elevando la glucemia mediante mecanismos de neoglucogénesis y glucogenolisis (19, 20-23).

### *Células delta ( $\delta$ ):*

Las células delta pancreáticas secretan somatostatina, la cual tiene dos formas bioactivas, una de 14 y otra de 28 aminoácidos. Se trata de una hormona que inhibe la mayoría de las secreciones celulares.

Se pueden encontrar células delta en el hipotálamo, el sistema nervioso central, neuronas periféricas y tracto intestinal (24). La distribución y morfología de las células permiten una red inhibitoria que transmite las señales nerviosas y hormonales al resto de la población celular. En el páncreas suponen entre el 5-8% de células del islote (3).

Morfológicamente son de menor tamaño que las beta y las alfa con una morfología externa semejante a la de las neuronas con procesos citoplasmáticos que se extienden desde los capilares del islote al centro de éste que permitirían una mejor comunicación entre las delgadas y finas células delta con sus vecinas de mayor tamaño alfa y beta (16).

### *Células PP:*

Son menos del 2% del total del islote en humanos y del 5% en roedores. La mayor concentración se encuentra en la cabeza de páncreas, donde se encuentra el 90% de todas las células PP (3). Este hallazgo se relaciona con un vestigio del origen embriológico del páncreas, donde, la porción ventral dará lugar al proceso uncinado y cabeza de páncreas (25). Morfológicamente son células elongadas que se encuentran en la periferia del islote en roedores y a lo largo de los capilares en humanos. Las células contienen gránulos electrodensos de tamaño heterogéneo conteniendo Polipéptido Pancreático. Este es un péptido de 36 aminoácidos que es segregado y regulado de forma postprandial por vía vagal. Tiene una acción inhibitoria en el intestino, reduciendo el vaciamiento gástrico y la peristalsis (16).

### Células épsilon ( $\epsilon$ ):

Las células épsilon durante periodos de ayuno secretan ghrelina (26). Esta hormona es secretada mayoritariamente en el fundus y antro gástricos y entre sus efectos destaca el orexigénico e inmunorregulador (27). No obstante, las células épsilon se localizan también en la periferia del islote y conforman menos del 1% de la masa celular del mismo en el adulto, mientras que en el feto ronda el 10%. Se encuentran tanto en roedores como en humanos distribuidos de una forma homogénea en todo el páncreas (3, 28).

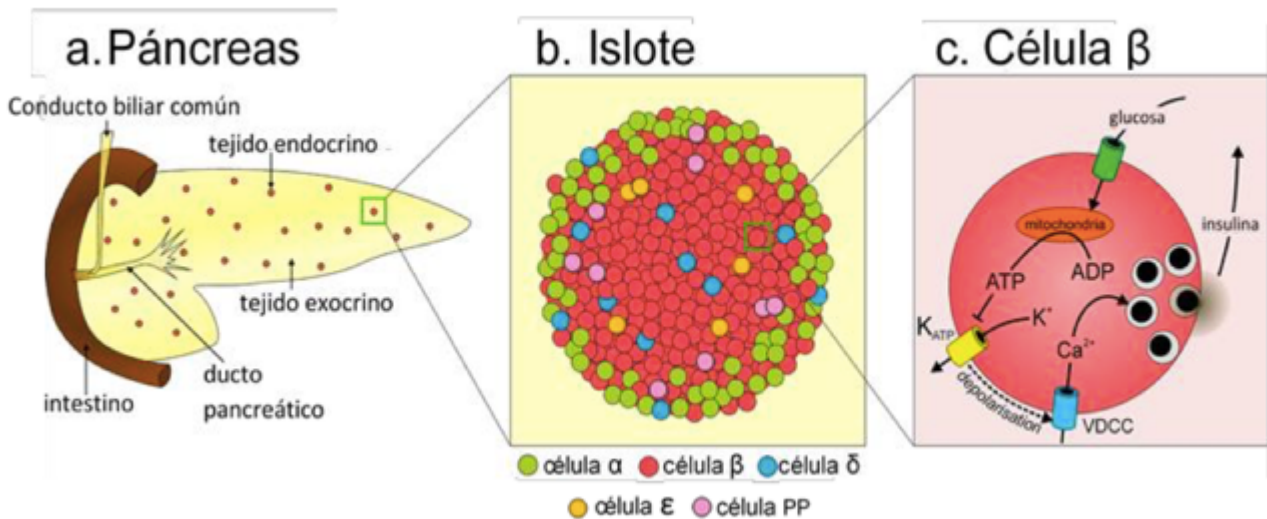


Figura 4. Modelo esquemático del páncreas (a), de la distribución de las células dentro del islote pancreático (b) y del mecanismo de secreción de la insulina (c) (47).

### 1.3. Anatomía, histología y fisiología del aparato digestivo adyacente

Dentro del aparato digestivo encontramos distintas vísceras relacionadas funcional y anatómicamente con el páncreas entre las que destacan:

### 1.3.1. El estómago

En humanos, macroscópicamente semeja un receptáculo en forma de “J”, el cual se une al esófago a través del cardias y al duodeno a través del píloro. Ambos, cardias y píloro, tienen una función esfintérica que permite el paso ordenado del bolo, favoreciendo su correcto vaciado al duodeno (una víscera de capacidad considerablemente menor) sin presentar reflujos esofágicos en condiciones fisiológicas. Es un órgano muy bien vascularizado, cuya irrigación depende de ramas del tronco celíaco (29).

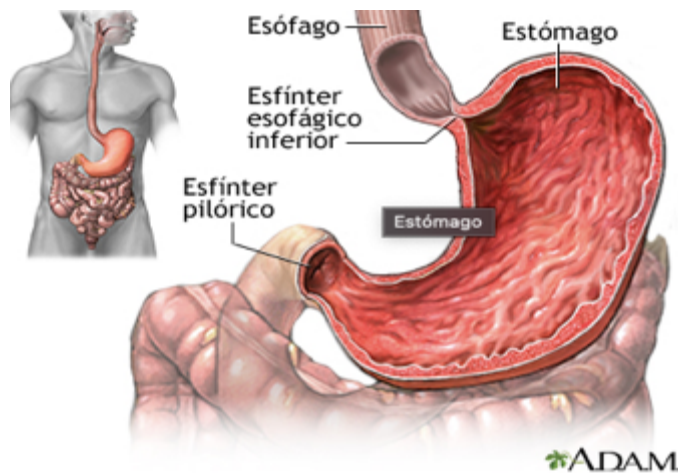


Figura 5. Anatomía del aparato digestivo proximal, donde destaca la cámara gástrica y el duodeno (<http://benergy2.adam.com>).

Histológicamente se caracteriza por presentar serosa, a diferencia del esófago. En la mucosa se distinguen distintos tipos de células. Desde las epiteliales, encargadas de la mitosis y defensa mucosa con la secreción de bicarbonato, a las células parietales y principales; encargadas de la secreción de ácido clorhídrico y pepsina respectivamente (30). Estas células secretoras se estimulan con la secreción de gastrina (producidas por las células G), secreción de histamina (producidas por las células enterocromafines) y la acción de la acetilcolina. La somatostatina (segregadas en las células delta pancreáticas) y las prostaglandinas modulan e inhiben la secreción ácida (31). Especial mención merece la ghrelina, que se trata, como mencionamos con anterioridad, de un polipéptido de 28 aminoácidos (32), que se secreta mayoritariamente en estómago, aunque encontramos una mínima expresión en otros tejidos (páncreas, riñón, placenta, intestino

y cerebro) (33-37). Entre sus funciones, la principal es el papel secretagogo de la hormona del crecimiento (GH) y de regulación del metabolismo energético. Su secreción sigue un ritmo circadiano con pico preprandial, con disminución tras la ingesta. Es un potente orexígeno con función en el núcleo arcuato hipotalámico, siendo evidente la implicación del eje gastrohipotalámico en el control del hambre (38).

Mientras que el bolo alimenticio permanece en la cámara gástrica, es producto de la digestión llevada a cabo por el ácido clorhídrico y distintas las enzimas pépticas segregadas por las células de la pared.

### 1.3.2. El Intestino delgado

Se trata de una víscera de 6-8 metros de largo dividida a la vez en tres segmentos. De más proximal a distal encontramos el duodeno, separado del estómago por el píloro; dista a él encontramos el yeyuno y finalmente el íleon, que se une al ciego a través de la válvula ileocecal. Con gran

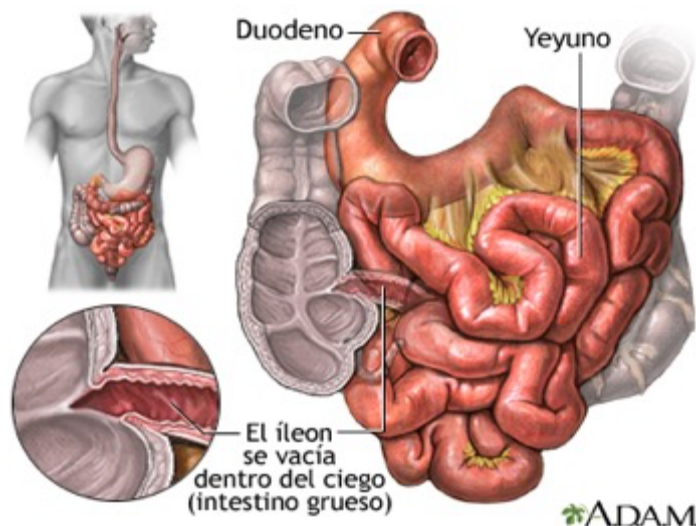


Figura 6. Modelo esquemático del intestino delgado (<http://benenergy2.adam.com>).

capacidad secretora y contráctil, es el órgano al que vierte su contenido el estómago, páncreas y árbol biliar, favoreciendo la digestión del quimo, que pasa a convertirse en quilo (39).

Los lípidos son digeridos por la lipasa pancreática y convertidos en triglicéridos y fosfolípidos, los cuales se absorben en yeyuno. Las sales biliares son de gran importancia para emulsionar estas grasas y favorecer su correcta

absorción. Los hidratos de carbono son procesados por la amilasa y disacaridasas y absorbidos como monosacáridos en yeyuno e íleon. Las proteínas son digeridas por las pepsinas y proteasas, para ser absorbidas en yeyuno e íleon. Además de secretar jugos y enzimas digestivas, también producen hormonas con un papel fundamental en la regulación del metabolismo hidrocarbonado. Es el caso de algunas enterohormonas como Glucagon Like Peptide-1 (GLP-1), Glucose Insulinotropic Peptide (GIP) o Peptide Tyrosine-Tyrosine (PYY).

#### 1.4. La regulación fisiológica de la glucemia

La glucosa forma parte del grupo de los carbohidratos y es el monosacárido más abundante en la naturaleza (40). Constituye la principal fuente de energía para la mayor parte de los organismos. Aunque un gran número de tejidos, durante los periodos de ayuno, pueden obtener energía también de otras fuentes menos rentables como aminoácidos o lípidos (41).

En el hombre la glucemia o concentración de glucosa en sangre en condiciones normales oscila entre los 70-100

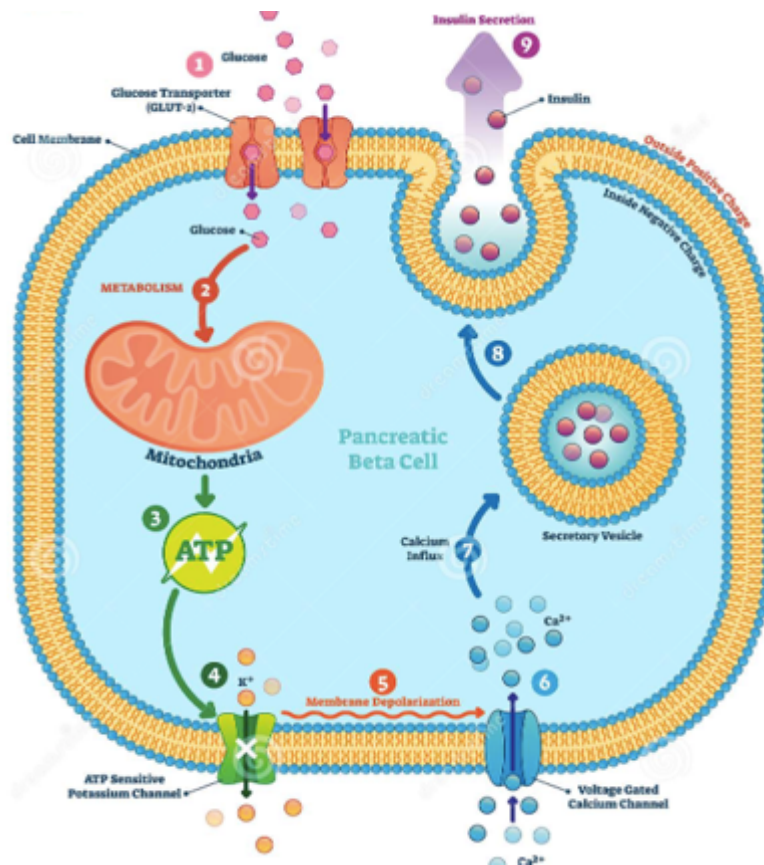


Figura 7. Modelo esquemático de la secreción de insulina. Modelo libre de derechos de VectorMine ([https://es.dreamstime.com/vectormine\\_info](https://es.dreamstime.com/vectormine_info)).



mg/dl en ayunas y siempre por debajo de los 140 mg/dl tras dos horas de la última ingesta (42). Para mantener estos niveles en rango, existe un mecanismo regulatorio de feedback negativo que bascula sobre tres ejes que son la capacidad del hígado y tejidos periféricos para incorporar glucosa del torrente sanguíneo, la capacidad de la insulina secretada por las células beta pancreáticas para estimular dicha retirada de glucosa y la capacidad por parte del glucagón secretado por las células alfa pancreáticas para estimular la liberación de glucosa por el hígado al torrente sanguíneo (40).

Como describimos con anterioridad, niveles altos de glucemia son capaces de desencadenar la liberación de insulina por las células beta mediante un mecanismo en el cual transportadores GLUT de la membrana plasmática incorporan glucosa al interior de la célula beta, que gracias a reacciones oxidativas incrementan la concentración de ATP, lo que supone la activación de canales de  $K^+$  ATP dependientes que despolarizan la membrana plasmática permitiendo la incorporación de  $Ca^{++}$  al interior de la célula beta, permitiendo la exocitosis de gránulos de insulina (14).

A nivel hepático, esta insulina en sangre previamente secretada por la célula beta es capaz de unirse a receptores IRS1/IRS2, lo cual desencadena una cascada de procesos de fosforilación que regulan el tráfico de proteínas transportadora tipo GLUT4, involucradas en el proceso de incorporación de glucosa al interior celular tanto del hígado como del músculo esquelético (15, 43). La glucosa incorporada se incorporará a largas cadenas poliméricas de glucógeno por la acción de la glucógeno sintasa (44).

Por otro lado, el glucagón es secretado ante niveles limitados de glucosa en sangre gracias a la activación de canales de  $K^+$  ATP dependientes de la membrana de las células alfa ante bajas concentraciones de glucosa, mientras que la presencia de insulina o altos niveles de glucosa inhiben este proceso (45). Este glucagón en el tejido hepático es capaz de aumentar el AMPc intracelular activando la proteinkinasa, que mediante procesos de fosforilación degrada el glucógeno en moléculas de glucosa en un proceso llamado glucogenolisis, dando lugar a un aumento de los niveles de glucemia (46).

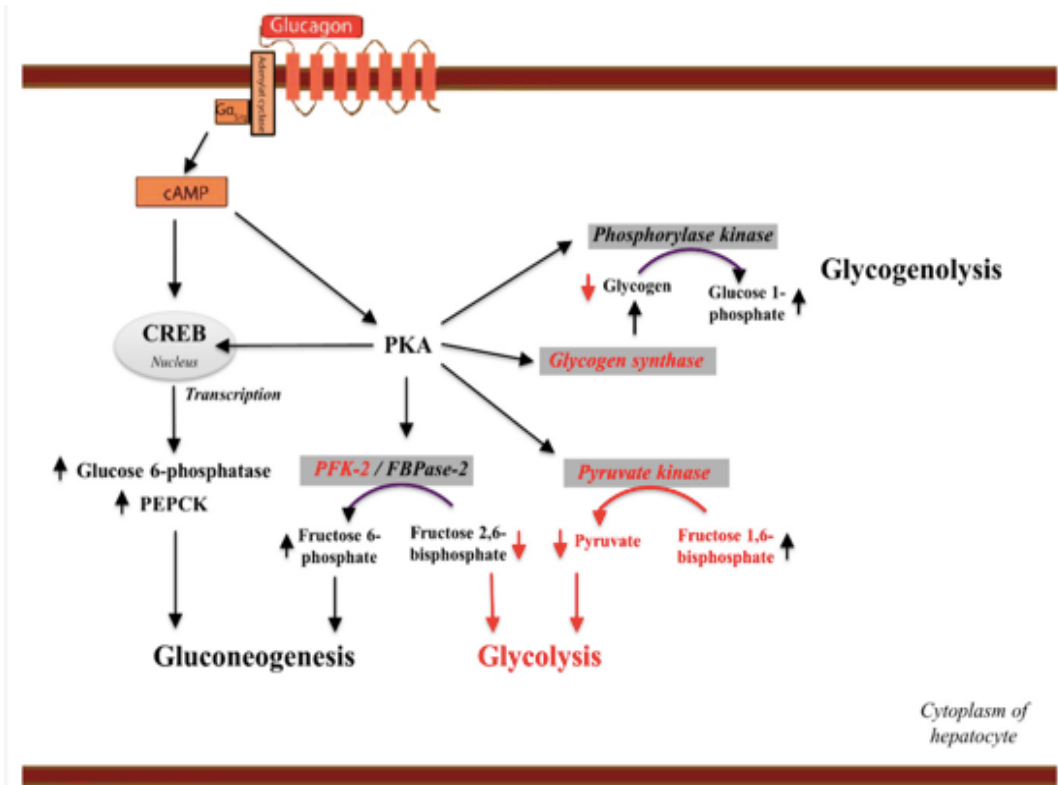


Figura 8. El papel del glucagón en la glucogenólisis (48).

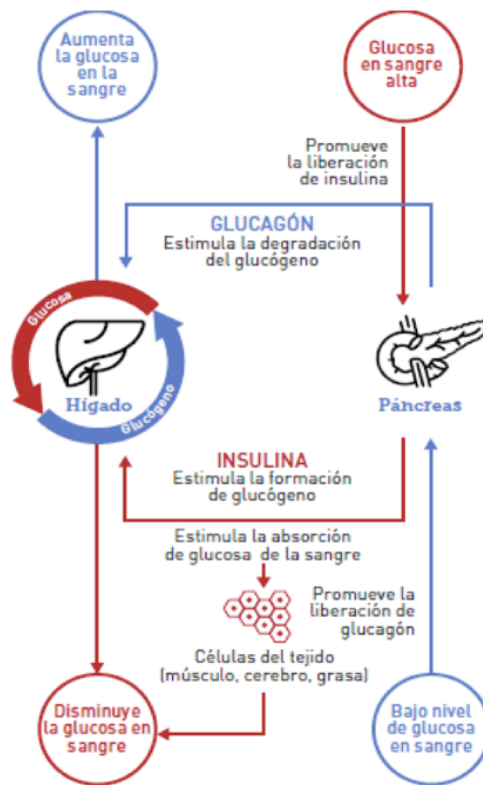


Figura 9. Modelo esquemático donde se identifican las funciones antagónicas de insulina y glucagón así como los estímulos que llevan a su secreción. Imagen tomada de la 8ª edición de Diabetes Atlas (49)

## **2. Los mecanismos homeostáticos dentro del páncreas endocrino**

Históricamente, el histólogo francés Édouard Laguesse (50), describió en la década de 1870 como la población del islote pancreático presenta su crecimiento y diferenciación mayormente durante la fase embrionaria del desarrollo. Si bien es cierto que describió la posibilidad del islote de presentar cierto crecimiento una vez desarrollado el órgano en la vida adulta gracias a la diferenciación de los grupos celulares del tejido periductal (6).

El páncreas endocrino está sujeto a una serie de factores que van a determinar la regulación de la masa beta pancreática. Tanto durante su crecimiento y desarrollo, como una vez ya maduro, en condiciones fisiológicas como patológicas (diabetes, pancreatitis, etc.).

La homeostasis de las poblaciones celulares de carácter endocrino se basa en el correcto equilibrio entre los fenómenos de proliferación desde células preexistentes del mismo tipo, neogénesis por diferenciación desde células precursoras y muerte celular o apoptosis (51).

Estos mecanismos no son excluyentes entre sí, pudiendo coexistir en un mismo momento, caso de la regeneración tisular tras lesiones pancreáticas o el desarrollo postnatal.

### **2.1. Apoptosis o muerte celular programada**

La apoptosis es un mecanismo activo, regulado y programado de muerte celular. Puede ser activado o inhibido en función de diversos estímulos, tanto en un contexto fisiológico como patológico (52).

Se caracteriza por una condensación del citoplasma y una fragmentación del DNA mediado por una familia de proteínas denominadas Caspasas (53).

Posteriormente la célula da lugar a múltiples cuerpos bien estructurados y rodeados de membrana llamados cuerpos apoptóticos. Que generalmente son fagocitados por células del tejido conectivo (52).

Implicada en la remodelación del tejido endocrino del páncreas postnatal y tras la lactancia en mamíferos, sus tasas fisiológicas se mantienen estables durante la vida adulta (54-56).

## **2.2. Hiperplasia / Hipertrofia**

Dentro de los mecanismos que afectan al volumen del páncreas endocrino debemos mencionar también la hiperplasia y la hipertrofia celular. La primera supone un aumento de la población celular, en contraposición a la hipertrofia, que es aquel mecanismo mediante el cual aumenta la masa celular a expensas de la población ya existente mediante el crecimiento del tamaño celular (57).

En roedores, durante la juventud, ambos mecanismos aparecen juntos en el desarrollo del páncreas. Mientras que en la senescencia solo parece estar implicada la hipertrofia celular en el mantenimiento del volumen del páncreas endocrino. Afectando principalmente a la población celular-beta (54).

## **2.3. Proliferación**

Cuando la replicación celular se da en células de una estirpe establecida, el fenómeno se denomina proliferación celular (58, 59).

En roedores, un gran número de factores de crecimiento y agentes mitóticos están implicados en los procesos de proliferación como la Proteína Relacionada con la Hormona Paratiroidea (PTHrP), Factor de Crecimiento Hepatocitario (HGF), Factor de Crecimiento Insulínico 1 (IGF-1), Gastrina, etc.

Sin embargo, estos factores parecen no tener efecto en la homeostasis del páncreas humano (60).

La proliferación de la masa beta pancreática humana parece darse de forma substancial sólo durante la embriogénesis e infancia del individuo y está mediada por dos principales vías de señalización que regulan la expresión de genes de supervivencia y de control del ciclo celular, como son la vía de las MAP quinasas (Mitogen-activated protein kinases) y la AKT/PI3K (Phospho-inositide 3 kinase) (61, 62).

#### **2.4. Neogénesis (diferenciación y transdiferenciación celular)**

De forma genérica, este fenómeno se define como la aparición de un determinado linaje celular por diferenciación de células precursoras.

El fenómeno de neogénesis juega un importante papel en el desarrollo fetal (63, 64), decayendo tras el nacimiento hasta ser prácticamente inexistente en la vida adulta en condiciones normales según Meier et al (65). Si bien puede reaparecer ante exposición a tóxicos o a determinadas lesiones mecánicas que afecten al páncreas endocrino u otras vísceras (pancreatectomía o técnicas bariátrico / metabólicas).

Relacionada con ésta última debemos hacer mención al fenómeno de nesidioblastosis, que tras intervenciones quirúrgica de índole bariátrico-metabólica consiste en la aparición de islotes pancreáticos completos “de novo” a partir de precursores de linaje endocrino con una distribución anárquica dentro del parénquima pancreático, capaces de condicionar estados de hipoglucemia postquirúrgicas que en ocasiones obliga a la reversión de la técnica ante la incapacidad para control glucémico seguro (66).

El desarrollo pancreático supone una elaborada cascada de marcadores interrelacionados entre sí que condicionan un patrón complejo de diferenciación celular y selección de linaje (67-69). De tal forma, el Pdx-1 (Pancreatic and duodenal homeobox 1) presenta un papel importante en el desarrollo inicial del páncreas inmaduro (70, 71). A su vez, la Neurogenina 3 (Ngn3) se encarga de seleccionar el linaje endocrino (72). La asignación de la estirpe celular va a venir designada por la interacción de otros factores diferentes como Arx y proteínas de la familia Pax.

En mamíferos, nueve genes Pax se clasifican en cinco diferentes subclases. De ellas, Pax4 y 6 comparten una de estas subclases, y particularmente el gen Pax4 ha demostrado ser un factor regulador crucial en el desarrollo del páncreas en mamíferos (73).

De esta forma, Pax4 asigna el linaje beta y delta, mientras que Arx (Aristaless-related homeobox) ha demostrado estar involucrado en el linaje alfa (73-75).

Si bien hasta ahora lo expuesto se refiere al desarrollo embrionario, estos procesos pueden darse en la vida adulta igualmente. De tal modo que la expresión anómala de Arx en células beta maduras producen su conversión hacia células con características alfa o PP (76).

Quizás mayor relevancia clínica supone la posibilidad de regeneración y conversión de células alfa en células con características beta ante una expresión ectópica de Pax4 (77, 78).

Esta compleja cascada de interacciones entre la población celular alfa y beta ha quedado suficientemente demostrada en la literatura disponible, de tal modo que como demostró Herrera et al, el páncreas inmaduro durante su desarrollo se caracteriza por una oleada de diferenciación a costa de células inmaduras que expresan tanto glucagón como insulina, si bien estas células no colonizan el resto del islote (79). Por otro lado, Thorel et al. identifican en

estudios basados en técnicas de ablación celular que más del 99% de la población celular beta que ha sido eliminada origina una conversión masiva de células alfa en células que expresen insulina (80). Dhawan et al. y Papizan et al, ambos en 2011, demostraron que la eliminación de la Dnmt1 (DNA metiltransferasa 1), redundante en una conversión a células glucagón positiva a través de la activación de Arx dependiente de Nkx2.2 (81, 82); y como estos, múltiples estudios más que demuestran la enorme complejidad de este entramado de interacciones entre factores de transcripción antagonistas, pero complementarios a la vez.

En la siguiente figura se puede apreciar una comparativa del desarrollo embrionario de la célula beta pancreática en ratones y humanos. Donde se identifica el comienzo de la cascada de eventos con la aparición del endodermo y se identifican distintas etapas caracterizadas por la aparición de distintos marcadores como Pdx-1, Ngn3, Arx y Pax4, asociados a la generación y diferenciación celular (83-88).

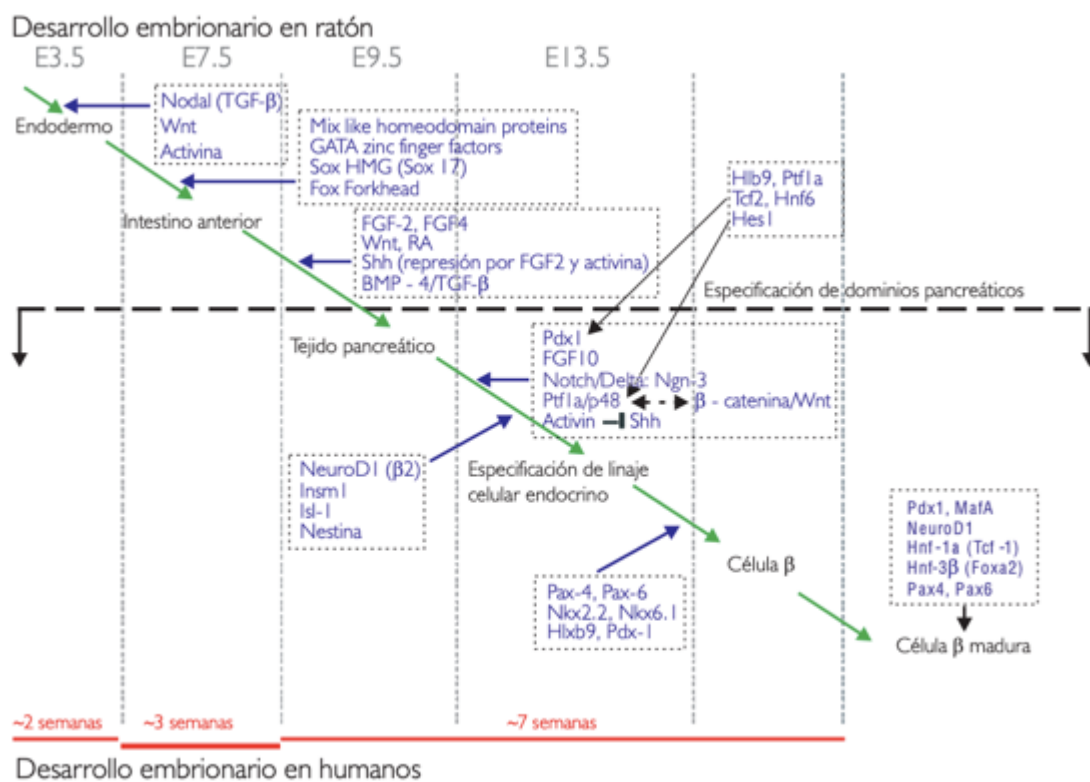


Figura 10. Comparativa de la cascada de desarrollo embrionario de la célula beta pancreática y los factores implicados (8).

### **3. La Diabetes Mellitus 1, la Diabetes Mellitus 2 y otros tipos de diabetes**

El término “diabetes mellitus” agrupa un conjunto de patologías del metabolismo hidrocarbonado que se caracterizan por presentar unas glucemias elevadas. Puede estar asociada o no a una secreción insuficiente de insulina a la vez que a cierta resistencia a esta en sus órganos diana. En función de la existencia de estas características, distinguiremos Diabetes Mellitus Tipo 1 o Tipo 2, MODY y LADA

#### **3.1. La Diabetes Mellitus tipo 1**

Se caracteriza por la secreción insuficiente, en muchos casos inexistente, de insulina. Es un trastorno autoinmune de debut precoz durante la niñez/adolescencia del individuo. En ella existen autoanticuerpos reactivos a los antígenos de las células beta pancreáticas, los cuales determinan su destrucción y por ende la insuficiente secreción de insulina. Esto determinará un aumento de la glucemia ya que no existe hormona que facilite el ingreso de glucosa en el medio intracelular. Supone el 5-10% del total de pacientes diabéticos (89).

#### **3.2. La Diabetes Mellitus Tipo 2**

Se trata de un trastorno adquirido durante la edad adulta, relacionado en la mayoría de las ocasiones con un sobrepeso, que determina una resistencia de los tejidos periféricos, principalmente ligado a la acción de la insulina (89).

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) determinó los criterios diagnósticos de diabetes en 1997: 1. niveles de hemoglobina glicosilada; 2.



glucosa en plasma en ayunas y 3. hiperglucemia aleatoria sintomática o test de tolerancia oral de glucosa anómalo (90-92).

Clínicamente, el cuadro se caracteriza por aparición de glucosuria, debido a que el umbral de absorción renal de glucosa se ve superado, lo que, por mecanismos osmóticos, deriva en poliuria (cuando las cifras de glucemia son >180 mg/dl). Esta poliuria va a suponer a la larga un estado de hipovolemia, con clínica de deshidratación, que el paciente intentará paliar con aumento de la ingesta de agua o polidipsia. Esta triada sindrómica es compartida con los otros tipos de diabetes.

### **3.3. La Diabetes Mellitus tipo LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults)**

Puede considerarse como un subtipo de la DM tipo 1 aunque debido a su debut tardío es comúnmente confundida con una DM tipo 2. Se caracteriza principalmente por la existencia de anticuerpos circulantes dirigidos a las células beta del islote pancreático (ICA o GAD65) (93). Inicialmente no precisan insulino terapia, pero suelen progresar hasta hacerse dependientes de ésta al cabo de meses o incluso años (94).

Los pacientes con este tipo de DM forman parte de un grupo heterogéneo sin una clara relación en cuanto a títulos de anticuerpos, IMC y la progresión a dependencia de insulina. Sí se ha identificado cierta tendencia a la insulino dependencia en pacientes con títulos altos de anticuerpos GAD65, lo cual podría considerarse un factor predictor para fracaso de tratamiento oral antidiabético (95).

### **3.4. La Diabetes Mellitus tipo MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young)**

Es una entidad que cursa como una diabetes no insulino dependiente en personas menores de 25 años en ausencia de anticuerpos circulantes y de transmisión autosómica dominante (96). A su vez se subdivide en múltiples subtipos, asociándose cada uno de ellos a un defecto genético concreto. Los genes involucrados son aquellos encargados del desarrollo, crecimiento y función pancreática, dando lugar a una sensibilidad y secreción insulínica inadecuada (97). Clínicamente son muy heterogéneas, pudiéndose confundir con DM tipo 1 o 2 (98).

### **3.5. Mecanismos patogénicos en la DM2**

La base fisiopatológica que explica la DM2 tiene como piedra angular el agotamiento de la población de células beta del páncreas y su desaparición progresiva. Varios factores han sido propuestos como responsables de ello, en algunos casos de manera concomitante. Entre ellos destacan:

#### **3.5.1. Resistencia insulínica**

Que podríamos definir como la incapacidad de los órganos diana como el hígado, músculo y tejido adiposo principalmente, para responder de manera proporcional y suficiente a los niveles plasmáticos de esta hormona. Este fenómeno parece estar íntimamente relacionado con el exceso de grasa abdominal perivisceral y los altos niveles circulantes de ácidos grasos no esterificados (99). Esto podría ser debido a la actividad en determinados tejidos, sobre todo el adiposo, de la lipasa, que es inhibida por la acción de la insulina y que al activarse provoca el incremento plasmático de ácidos grasos no esterificados llegando a formarse depósitos de estos en hígado por acción

de transportadores específicos en los hepatocitos; los llamados Fatty acid transport protein-5 (FATP-5) (180). Pero además la resistencia a la insulina en el propio hígado puede ser favorecida por depósitos grasos ya que estos parecen inducir la inactivación por fosforilación del receptor de la insulina por la Proteína kinasa C (PKC –  $\epsilon$ ) en un proceso retroalimentado (181).

Este contexto de resistencia a la insulina deja abierta dos posibles teorías que expliquen el agotamiento celular tan típico de las fases avanzadas de DM tipo 2. Así, hay grupos que entienden que este aumento de la resistencia lleva a un incremento compensatorio de la secreción de insulina por parte del páncreas que, si bien en estadios iniciales puede mejorar la situación, en fases más tardías termina agotando la población celular beta, dando lugar a hipoinsulinemia que precisan del aporte exógeno de la misma. Otra teoría aboga por que son los mismos factores que dan lugar a esta situación de resistencia insulínica los que finalmente agotan a la glándula (96).

Varios factores parecen jugar un papel relevante en estos mecanismos patogénicos:

#### *Glucotoxicidad:*

La diabetes se caracteriza por presentar hiperglucemias mantenidas. Estos niveles elevados de glucosa de manera sostenida en sangre son capaces de ejercer un efecto deletéreo en la población celular beta pancreática. Este efecto pivota sobre tres vías. En primer lugar, el propio estrés oxidativo y daño tisular derivado de la glicosilación. En segundo lugar y a nivel intracelular el estrés del retículo derivado de la alta demanda de insulina que llega a alterar la morfología mitocondrial interfiriendo en funciones celulares esenciales, y por último la pérdida gradual de la expresión del gen de la insulina y factores asociados como el Insulin Promoter Factor (IPF-1) observado en estados avanzados de hiperglucemia en modelos animales (182).

### *Lipotoxicidad:*

Esta situación es generada por el aumento de los ácidos grasos no esterificados circulantes, dentro del contexto de la enfermedad metabólica que conlleva altos niveles intracelulares en las células beta lo que tiene como consecuencia la activación de vías metabólicas no oxidativas, la formación de ceramidas, la degradación lisosomal y la generación de estrés de retículo endoplásmico (183)). Este último tiene como consecuencia la activación de vías de señalización relacionadas con el inicio de la muerte celular programada o apoptosis (99).

### 3.5.2. Autoinmunidad e inflamación

Los sujetos con DM2 están expuestos a un gran estrés derivado de la pérdida del equilibrio entre reducción y oxidación a favor de esta última con un aumento en la producción de radicales libres. Este estrés se manifiesta con la inflamación del tejido adiposo, la hiperplasia grasa y la disfunción mitocondrial (100). En este contexto se activan interleucinas que provocan la inflamación crónica multiorgánica (páncreas, riñones, etc.) que dará lugar a su disfunción a largo plazo (101).

De igual forma, parece que hay un componente autoinmune que, si bien es mucho menor que en la DM1, puede tener cierto papel en aquellos sujetos que debutan con más de 40 años. Estos individuos suelen presentar características antropométricas que difieren de aquellas que se observan clásicamente en pacientes con DM tipo 2 (102).

### 3.5.3. El péptido amiloide (amilina)

Se almacena en los gránulos secretorios de las células beta del islote y son cosecretados junto con la insulina, resultando en una concentración sérica 1/10 de la de insulina. En tejido pancreático de sujetos con DM2 se ha demostrado en cantidades aumentadas (103). No obstante, este hallazgo no parece claro que esté en relación directa con la patogénesis de la enfermedad, sin tener claro si se trata de una causa o consecuencia de ésta (104).

### 3.5.4. Las adipocinas

Son péptidos que modulan la señal del estatus funcional del tejido adiposo en distintos órganos diana como el cerebro, páncreas, hígado y sistema inmune entre otros mediante mecanismos de acción complejos que activan distintas rutas a nivel de diferentes receptores de membrana (105).

De tal modo, la secreción de adipocinas (leptina, adiponectina, factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21), etc., se encuentra alterada en estados de disfunción del tejido adiposo y esto contribuye en la aparición de un amplio espectro de patologías relacionadas con la obesidad (106).

Dentro de este gran grupo de desórdenes se encuentra la DM tipo 2; entidad que ha demostrado una relación significativa con niveles inadecuados de adipoquinas circulantes en sangre (105).

Los efectos de las distintas adipocinas conocidas en la célula beta del islote pancreático son múltiples y heterogéneos, incluso en ocasiones hasta contradictorios.

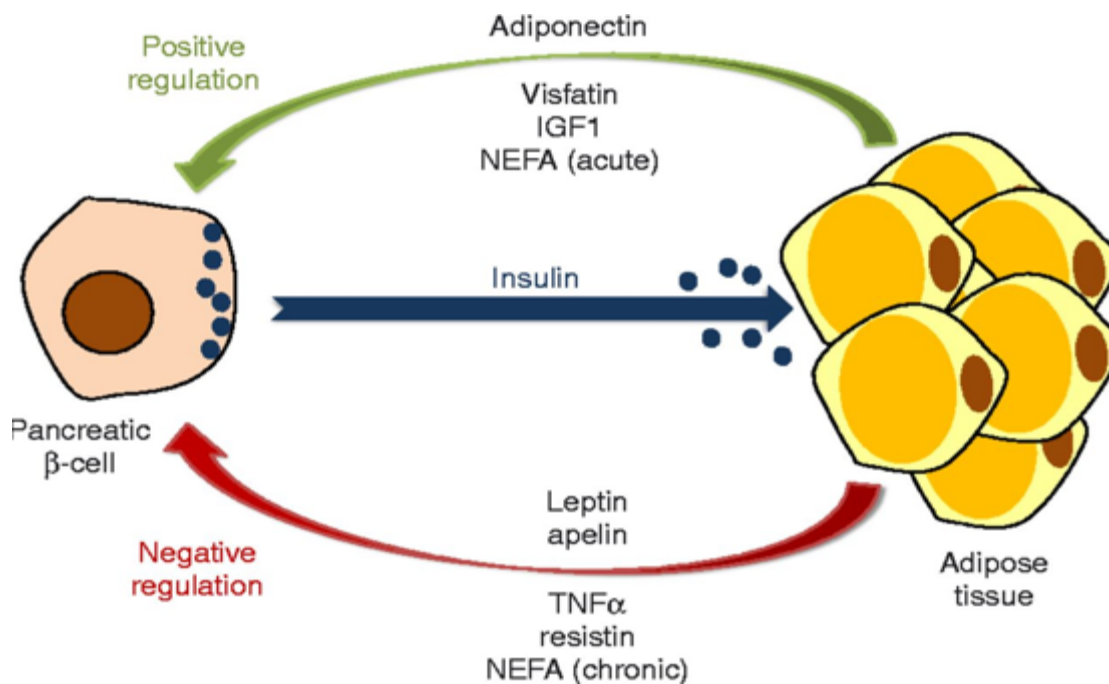


Figura 11. Acción reguladora de distintas adipoquinas sobre la célula beta pancreática (105).

En el marco de actuación de uno o varios de los fenómenos anteriormente descritos, como ya hemos dicho la población de células beta, ante la situación de estrés, sufre un incremento en el ratio de células apoptóticas que a largo plazo culmina en la desaparición de esta en su práctica totalidad y la consecuente caída de la producción de insulina que agrava la situación (99).

Recientemente se han propuesto también mecanismos alternativos a la apoptosis para explicar la pérdida de la masa celular beta que vendrían dados por la llamada transdiferenciación de al menos una parte de las células beta pancreáticas a otros tipos celulares tales como alfa o épsilon en respuesta a esa situación de estrés sostenida en modelos de roedor diabético (107).

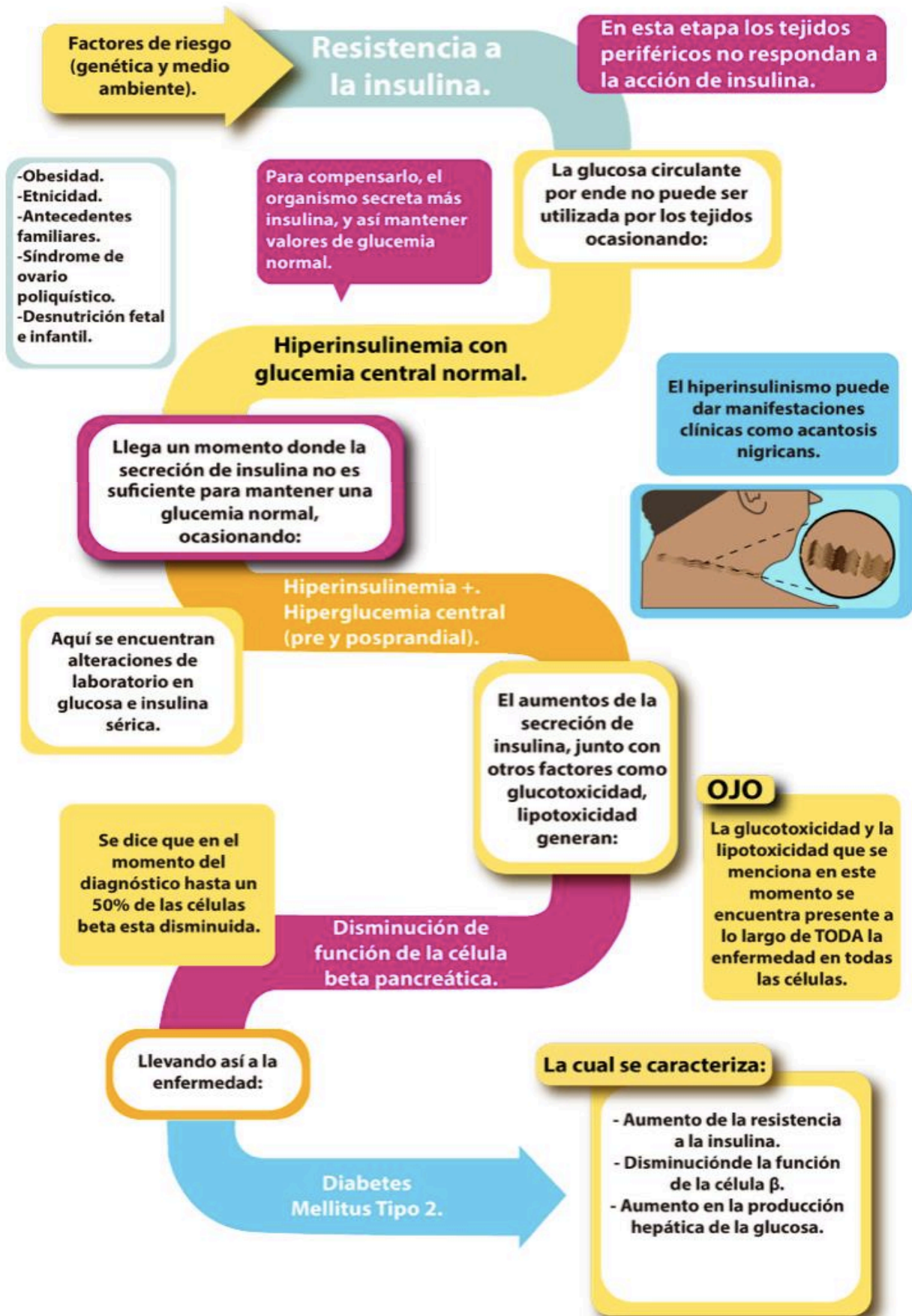


Figura 12. Modelo esquemático del desarrollo de la Diabetes Mellitus 2. Imagen tomada de la página web del departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM (108).

#### **4. Incretinas y cirugía.**

##### **4.1. Incretinas y su implicación en el metabolismo de la glucosa.**

Dentro de la regulación del metabolismo glucídico, que aparece alterado en el caso de la DM2, juegan un importante papel una serie de hormonas gastrointestinales cuya secreción esta mediada por la ingesta. Son las llamadas incretinas (109). Numerosos estudios se han realizado entorno a estas, destacando el papel de algunas como GLP-1 o GIP (110-119).

Un ejemplo ilustrativo del papel que juegan estas enterohormonas en la homeostasis glucídica es la mayor secreción de insulina tras la ingesta oral de glucosa que tras la administración intravenosa (114).

El GLP-1 se produce a partir del proglucagón en células L, presente en segmentos medios y distales del intestino delgado (yeyuno medio e íleon) ante la llegada del bolo alimenticio. Otros metabolitos activos como el glucagón y el GLP-2 se sintetizan a partir del mismo gen. El GLP-1 es activado por la proconvertasa-1, mientras que lo inhibe la dipeptidilpeptidasa IV (DPPIV), de forma que la vida media del GLP-1 endógeno es de 2-3 minutos (110).

Esta proteína se enlaza a un receptor específico GLP-1 que se expresa en varios tejidos, entre ellos el páncreas, estimulando la liberación de insulina (111). También ha demostrado tener efecto en el enlentecimiento del vaciado gástrico (112), reduce la ingesta de comida e inhibe la secreción anómala de glucagón postprandial (113, 114). En modelos animales estimula la proliferación y diferenciación de células beta pancreáticas. (115, 116).

El GIP es secretado por las células K presentes en porciones más proximales de intestino delgado, encontrándose altamente concentradas en duodeno y yeyuno proximal. Tanto las células K como las células L son de tipo abierto, es decir, presentan un proceso apical con microvellosidades en continuo



contacto con lumen intestinal (117, 118). La efectividad de esta hormona se encuentra prácticamente abolida en pacientes con DM2, a diferencia del GLP-1 que sí mantiene su efecto estimulador (119).

**Table 1**

Summary of the effects of GLP-1 and GIP: similarities and differences.

Effects	GIP	GLP-1
Beta cell proliferation/apoptosis inhibition	↑↑	↑↑
Insulin secretion	↑↑↑	↑↑↑
Insulin secretion in T2DM	(↑)	↑↑
Glucagon secretion	↑↑	↓↓↓
Somatostatin (pancreatic) secretion	↑↑	↑↑
appetite	→	↓↓
Food intake	→	↓↓
Body weight	→	↓↓
Efferent vagal activity	→	↓↓
Gastric emptying	→	↓↓ <sup>a</sup>
Gastro-pancreatic secretion	→	↓↓ <sup>a</sup>
Mesenteric blood flow	↑	→
Adipose tissue blood flow	↑↑	→
Heart rate	↑	↑↑
Adipocytes (lipolysis, lipid uptake) <sup>b</sup>	↑↑	→
Bone resorption	↓↓↓	↓
Bone formation	↑	→

<sup>a</sup> Via inhibition of the efferent vagus.

<sup>b</sup> Lipolysis in the absence of insulin, net lipid uptake in the presence of insulin.

Figura 13. Principales efectos del GIP y GLP-1 (129).

#### 4.2. La cirugía bariátrico/metabólica

Estas incretinas han tomado un papel más relevante si cabe en el estudio de la patogénesis de la DM2 desde el desarrollo de la llamada cirugía bariátrica/metabólica.

La cirugía bariátrica/metabólica se define como “la manipulación de un órgano o sistema normal para alcanzar un resultado biológico en aras de una potencial mejoría de la salud” (120).

Los beneficios de la cirugía bariátrica frente al tratamiento convencional están más que demostradas en términos de pérdida de peso, control de comorbilidades y calidad de vida (121).

Los criterios generales según la IFSO (International Federation for the Surgery of Obesity and Metabolic Disorder) para ser candidato a cirugía bariátrica son: IMC > 40 kg / m<sup>2</sup>; o bien IMC > 35 - 39.9 kg / m<sup>2</sup> con comorbilidad mayor (DM2, HTA, apnea del sueño, etc.) que afecte a calidad de vida (122).

Las distintas técnicas de cirugía bariátrica descritas se clasifican en tres grupos distintos:

- Restrictivas: limitan la capacidad del estómago remanente.  
Gastroplastias, Banda Gástrica Ajustable y Sleeve Gástrico.
- Malabsortivas: técnicas que limitan la absorción de nutrientes.  
Derivaciones Biliopancreáticas y Cruce Duodenal.
- Mixtas: Unen los componentes restrictivo y malabsortivos expuestos.  
Bypass Gástrico.

#### 4.2.1. Técnicas restrictivas puras

*Banda Gástrica Ajustable (BGA):*

Actualmente representa el 42% de los procedimientos bariátricos a nivel mundial. Reduce el volumen efectivo gástrico a 30-50 ml constituyendo un pequeño reservorio mediante un dispositivo de inflado subcutáneo (123). Esta técnica no supone la resección de ningún órgano y es completamente reversible. La pérdida ponderal

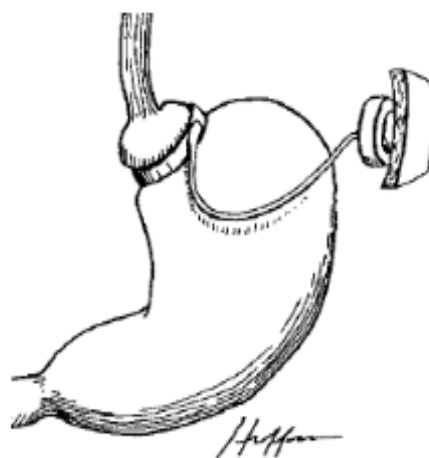


Figura 14. Banda gástrica, nótese dispositivo subcutáneo conectado a la banda. (149)

asociada es más progresiva, pero se mantiene más duradera en el tiempo. Presenta una tasa de mejoría de DM2 entorno al 50 – 60% (123, 124).

#### *Gastrectomía vertica (SG):*

Inicialmente descrita como primer paso del cruce duodenal, actualmente se considera una técnica por sí sola. Consiste en la resección de la curvatura mayor gástrica, dejando un remanente tubular a expensas de la curvatura menor (123). Esta técnica, aunque considerada restrictiva, sí origina una disminución mantenida de la secreción de ghrelina (enterohormona con efecto orexígeno) y un vaciado gástrico más rápido, con el consecuente aumento en la producción de GLP-1. Esto motiva que cada vez sean más los grupos que la consideren como técnica mixta, lo cual explica una mejor respuesta metabólica, presentando una tasa de resolución de la DM2 entre el 65 – 70%. Existen pocos estudios con resultados a largo plazo (123, 124).

#### 4.2.2. Técnicas malabsortivas puras

##### *Derivación Biliopancreática (DBP):*

Técnica que consiste en una gastrectomía subtotal manteniendo remanente gástrico de 200 - 500 c/c al que se le realiza una gastroyeyunostomía en Y de Roux con asa aferente de 200 cm de longitud, realizando el pie de asa en íleon terminal a 50 cm de válvula ileocecal (123). El mecanismo de acción fisiológico de dicha técnica radica en la derivación de lipasa, amilasa y sales biliares a segmentos muy distales del

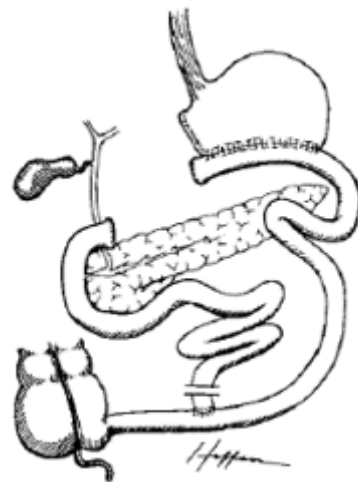


Figura 15. Derivación biliopancreática. Nótese gastrectomía subtotal con remanente de 200 - 500 cc. (149)

intestino delgado con la subsidiaria malabsorción de grasas. En dicha técnica hay que presentar especial atención a problemas derivados de la malabsorción de vitaminas liposolubles. Está indicada en grandes obesos (IMC > 60), jóvenes y con imposibilidad para el control de la ingesta (123, 124).

#### *Cruce Duodenal (CD):*

Basada en la técnica anterior, en este caso la gastrectomía subtotal se sustituye por una gastrectomía vertical con preservación pilórica. El remanente gástrico se anastomosa al asa alimentaria de unos 185 – 235 cm de largo, que al anastomosarse a la biliopancreática da lugar al asa común de unos 65 – 100 cm, quedando una superficie total con función absorbente de hasta 300 cm y por ende una mejor captación de vitaminas liposolubles (123).

Las técnicas malabsortivas obligan a los pacientes a suplementos de vitamina, hierro y calcio de por vida.

Las técnicas malabsortivas puras son las que presentan una mayor tasa de resolución de DM2, rondando entorno el 97% (124), aunque los déficits carenciales derivados de estas intervenciones junto con una mayor complejidad técnica suponen un mayor porcentaje de morbimortalidad asociada (123).

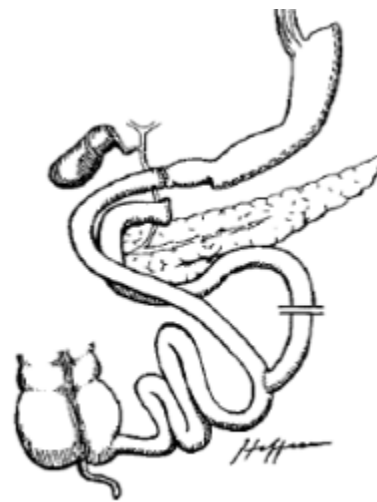


Figura 16. Cruce Duodenal. Nótese gastrectomía vertical y preservación pilórica. (149)

#### 4.2.3. Técnicas mixtas

##### *Bypass Gástrico (RYGB):*

Es la técnica bariátrica más antigua y más comúnmente realizada a nivel global. La técnica consiste en la confección de un remanente gástrico de 20 - 50 c/c (componente restrictivo) al cual se le realiza una gastroyeyunostomía en Y de Roux para dar un asa alimentaria de hasta 150 cm que finalmente se une al asa biliopancreática. Se considera el patrón de oro de la cirugía bariátrica. Está indicado en pacientes con IMC > 50 refractario a técnicas restrictivas y síndrome metabólico, presentando mejoría de la DM2 hasta en un 71% (123, 124).

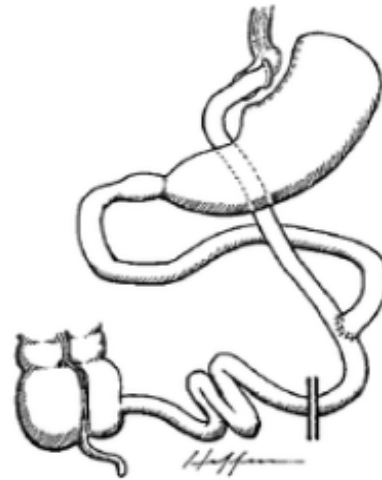


Figura 17. Bypass Gástrico. Nótese reservorio gástrico de 20 - 50 cc. (149)

#### **4.3. Bases teóricas de la cirugía bariátrica / metabólica**

Independientemente del tipo de intervención, una cosa común parece estar clara y es la capacidad de este tipo de técnicas para resolver la diabetes o al menos mejorar el metabolismo de la glucosa en los pacientes de una forma rápida y contundente. En este sentido numerosas teorías desde hace tiempo han intentado dar una explicación al respecto de las bases fisiopatológicas de este fenómeno.

En este intento, varias teorías implican a una o varias de las mencionadas incretinas en la constatada resolución de la DM2 ocurrida en un alto porcentaje de pacientes sometidos a este tipo de intervenciones previa a la pérdida de peso. Entre ellas, las más aceptadas son:

#### 4.3.1. Hipótesis intestino proximal

Esta hipótesis se basa en la falta de exposición o en la exclusión del antro gástrico, duodeno y yeyuno proximal al paso de los alimentos. Esto implica la disminución de la secreción de factores hormonales que teóricamente inducirían a la resistencia a la insulina y la DM2.

Autores como Rubino et al. proponen que el paso del bolo alimenticio a través del intestino proximal puede ser el responsable de la secreción de factores que evitarían el desarrollo de la acción de las incretinas (factor antiincretínico con efecto diabetogénico) y por lo tanto aumentar la resistencia insulínica (125-128). De este modo, los diferentes tipos de bypass, al eliminar el paso a través de los segmentos más proximales del intestino, provocarían un descenso de este factor diabetogénico y permitiría la resolución de la DM2. Este autor ha intentado clarificar esta teoría en múltiples estudios experimentales con ratas donde demuestra la mejoría en el control glucémico en ratas a las que se les había excluido el duodeno y yeyuno proximal del tránsito alimentario tras la realización de un bypass duodeno-yeyunal. Para explicar cómo la exclusión duodenal mejora la diabetes y la posible contribución del intestino delgado proximal a la fisiopatología de esta enfermedad, Rubino et al. desarrollaron la teoría de la "anti-incretina" (129).

Ésta postula la existencia de un mecanismo de regulación estimulado por el mismo tránsito del alimento por el intestino delgado proximal que conlleva la existencia de un factor anti-incretina que tendría acciones opuestas a las de las incretinas que de forma fisiológica evitaría la hipoglucemia inducida por éstas mismas (129). Mientras que una producción equilibrada y coordinada de incretinas y anti-incretinas sería necesaria para mantener niveles normales de glucosa, un cambio hacia la producción excesiva de anti-incretinas causaría resistencia a la insulina, disminución de la secreción de insulina y depleción de células, en otras palabras, diabetes tipo 2 (129).

Esto vendría corroborado por determinados trabajos en los que tras cirugías que impiden el paso de nutrientes a segmentos proximales del intestino delgado aparecen fenómenos de hiperinsulinemia, hipoglucemia y proliferación celular beta. No obstante, hoy en día aún no se ha podido determinar la naturaleza de ese factor anti-incretina con exactitud sin descartar, claro, que se trate de una hormona desconocida o un factor conocido para el cual las funciones aún no están completamente comprendidas.

#### 4.3.2. Hipótesis intestino distal

Sugiere que el paso de contenido alimentario al yeyuno medio (RYGB) o íleon distal (DBP-CD) podría ser el mecanismo que controla la DM2 en los pacientes sometidos a estas intervenciones. Rubino et al, también asocian a este paso prematuro a través del intestino distal (donde se encuentran las células L) el estímulo necesario para la liberación de hormonas como la GLP-1 y PYY (129).

De esta forma se incrementaría la proliferación beta-pancreática con la consecuente liberación de insulina, aumentando su sensibilidad y disminuyendo la apoptosis de las células del islote. En varios estudios experimentales se ha demostrado el aumento de la sensibilidad a la insulina tras la trasposición ileal (paso de un segmento ileal distal a una unión con el yeyuno proximal), mejorando así la tolerancia a la glucosa en comparación con los grupos control, lo cual corroboraría el efecto que tiene sobre el metabolismo glucídico el paso precoz del bolo alimenticio a través de un segmento de íleon distal. Sin embargo, esta mejoría también se identifica en otros estudios que determinaron la remisión de la diabetes en ratones diabéticos y con deficiencia funcional para GLP-1 operados con un RYGB - técnica que supone exclusión del paso a través del duodeno-, lo que no aporta certidumbre respecto a esta teoría (130).

### 4.3.3. Hipótesis de la microbiota

Recientemente otros factores se han relacionado con los cambios subyacentes a estas cirugías que podrían estar implicados con el efecto de estas sobre el metabolismo de la glucosa. Uno de los más llamativos es el cambio objetivado en las principales cepas bacterianas presentes en la luz intestinal.

La primera persona en relacionar los cambios en la microbiota con la obesidad fue Ley et al, que secuenció el ADN de la microbiota en ratones carentes de leptina y ratones sanos, mostrando las dos poblaciones mayoritarias (género Bacteroidetes y Firmicutes) y como la proporción variaba en función del fenotipo; un mayor ratio de bacterias del género Firmicutes en sujetos obesos frente a los sanos que presentaban una mayor proporción de Bacteroidetes (131).

La disposición de las distintas poblaciones de microbiota varía en función del segmento de tubo digestivo en cuestión, de tal forma que esófago y estómago presentan las menores poblaciones bacterianas y típicamente se tratan de anaerobios que derivan de la cavidad oral (estreptococos y lactobacilos). El yeyuno presenta una alta concentración de estreptococos igualmente (132).

Conforme progresamos en la longitud del tubo, el pH se tampona con bicarbonato, que junto con un menor peristaltismo permite el crecimiento de múltiples poblaciones de distinta índole como Bacteroides y Clostridium (132, 133).

De igual modo, la biotransformación de los ácidos biliares es un proceso colaborativo entre el huésped y la microbiota. Así, el hígado del sujeto sintetiza ácidos biliares primarios a partir del colesterol, los cuales son procesados por la flora bacteriana dando lugar a ácidos biliares secundarios (134).



Estos ácidos biliares secundarios se consideran señales moleculares que median en los procesos de inmunidad innata del sujeto, y cuyo estudio ayuda a dilucidar el papel hasta ahora desconocido que juegan en la prevención de diversos estados patológicos (condiciones inflamatorias crónicas, obesidad, enfermedades metabólicas, etc.) (135).



La cirugía bariátrica debe su efecto al parecer a múltiples factores que tienen un eje común: el cambio conformacional de la anatomía del tubo digestivo tras la intervención.

No obstante, y pese a todas estas teorías, un gran número de incógnitas subyacen a nivel fisiopatológico en este fenómeno. Sobre todo, si tenemos en cuenta la gran diversidad de técnicas bariátricas/metabólicas con diferentes implicaciones anatomofuncionales y posiblemente distintos mecanismos de actuación respecto a la remisión de la DM2.

Se hace necesario un estudio ordenado de los mecanismos subyacentes en cada segmento del tubo digestivo relacionados con los mecanismos mediante los cuales se da la mejoría en el metabolismo glucídico de pacientes intervenidos de cirugía bariátrica. Con el análisis de las técnicas estandarizadas en el momento actual es difícil discernir o acotar que efectos podemos asociar a que región del tubo digestivo. Esto, unido a la imposibilidad de realizar cirugías experimentales en pacientes por los obvios condicionantes éticos nos ha llevado al diseño experimental que ocupa este trabajo, la Transposición Ileal Preduodenal (PDIT), en el que utilizando un modelo de roedor sano evaluaremos la capacidad aislada del íleon para determinar cambios en el principal órgano regulador del metabolismo hidrocarbonado como es el páncreas endocrino.



**CAPÍTULO 2**  
**HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **1. Hipótesis**

### **1.1. Hipótesis conceptual**

Nuestra técnica experimental de cirugía metabólica aplicada en ratas Wistar sanas inducirá la adaptación del islote pancreático y repercutirá en cambios en los parámetros funcionales e histológicos en estudio del páncreas endocrino.

### **1.2. Hipótesis operativa**

Los modelos, intervenidos mediante una técnica experimental basada en el paso precoz del bolo a través del íleon terminal sin exclusión duodenal asociada, mostrarán cambios en la homeostasis glucídica.

Los roedores del grupo control no presentarán anomalía ninguna en el metabolismo glucídico.

Los cambios objetivados en el grupo experimental podrán ser a nivel funcional, a nivel histológico o ambos a la vez.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo General**

- Conocer los mecanismos que justifiquen la mejoría del metabolismo glucídico que sigue a la cirugía metabólica
- Establecer el comportamiento de la masa beta pancreática en los cambios funcionales y enterohormonales que acompañan a la cirugía metabólica cuando se produce una llegada temprana de nutrientes al íleon terminal sin abolir el paso duodenal.

## **2.2. Objetivos Específicos**

- Establecer un nuevo modelo experimental de cirugía metabólica que permita la llegada temprana de nutrientes al íleon terminal sin sacrificar el paso duodenal de los mismos.
- Valorar el peso durante el periodo de supervivencia y conocer si hay diferencias en la ganancia ponderal entre ambos grupos experimentales.
- Cuantificar glucemias basales como variable de adaptación fisiopatológica a la técnica experimental.
- Cuantificación funcional de la capacidad de respuesta a la sobrecarga oral de glucosa de células beta.
- Estudio inmunohistoquímico que ponga de manifiesto procesos de proliferación, neogénesis, así como transdiferenciación a costa de otra estirpe celular del islote como mecanismos de adaptación a la intervención quirúrgica.
- Correlacionar los cambios fenotípicos, funcionales e histológicos que ayuden a identificar el papel del íleon tras esta técnica experimental.



**CAPÍTULO 3**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**





## 1. Animales de experimentación

El estudio se realizó con ratas Wistar macho, sanos, con un peso entorno a los 250 gramos (g) de 12 a 14 semanas de vida. Estos animales fueron suministrados por el Servicio de Experimentación y Producción Animal (SEPA) de la Universidad de Cádiz (UCA).

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con lo dispuesto en la normativa legal vigente y, en particular, con el Real Decreto 1201/2005, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Se contó con el visto bueno del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Cádiz. La estabulación, procedimientos quirúrgicos, desarrollo de los protocolos y estudios se llevaron a cabo en el Departamento de Anatomía y Embriología de la Facultad de Medicina de Cádiz y en el Animalario de la Universidad de Cádiz (SEPA, Vicerrectorado de Investigación). Todas estas instalaciones cumplen con los preceptivos cumplimientos de las normas de bioseguridad.



Panel fotográfico 1. Animales de experimentación estabulados en condiciones descritas preparados para la sobrecarga oral de glucosa.

## **2. Materiales**

### **2.1. Materiales empleados durante la intervención quirúrgica y para el seguimiento funcional fenotípico de los animales**

- Isoflurano (Forane<sup>®</sup> Solución 100 ml Abbott<sup>®</sup>).
- Caja de material quirúrgico estándar (pinzas, mosquitos, tijeras y portas).  
Gasas estériles 7,5x7,5 cm (Texpla<sup>®</sup> quirúrgico).
- Alcohol 98° (Cinfa<sup>®</sup>) y Clorhexidina (Hibiscrub<sup>®</sup>).
- Material de sutura (Vicryl -Ethicon<sup>®</sup>- y Prolene -Braun<sup>®</sup>- de distinto calibre).
- Suero salino fisiológico (Braun<sup>®</sup> - Solución isotónica de cloruro sódico al 0,9%).
- Batido de reposición de dieta postoperatoria (Resource Protein<sup>®</sup> 200 ml. Nestle Nutrition<sup>®</sup>).
- Ibuprofeno (Dalsy<sup>®</sup> Mylan IRE Healthcare)
- Lanceta (MenaLancet Pro 23G<sup>®</sup>, Menarini Diagnostics)
- Glucómetro (Glucocard G-Meter 1810<sup>®</sup>, Menarini Diagnostics).
- Báscula de precisión (Ohaus serie Pioneer<sup>®</sup> Modelo PA 3102).
- Glucosa monohidrato (Glucocemin<sup>®</sup> B. Braun Medical 20% P/V)
- Sonda de Nelaton pediátrica

### **2.2. Materiales para la fijación de las muestras biológicas y procesamiento histológico previo a los estudios inmunohistoquímicos**

- Ácido Pícrico (Trinitrofenol, ácido nitroxántico) (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, Co, St Louis, MO, USA)

- Parafina de punto de fusión media. (Histoplast<sup>®</sup> Sintético Pellets Blancos).
- Alcohol absoluto; alcoholes gradados (ReagentPlus<sup>®</sup> Ethanol, Sigma Aldrich<sup>®</sup>, Co, St Louis, MO, USA)
- Vitrina extractora de flujo laminar Captair<sup>®</sup>
- PBS (Tampón fosfato salino, PH 7.2-7.4)
- Bomba de perfusión durante sacrificio.
- Heparina sódica (Clexane<sup>®</sup> 4000 UI, Sanofi-Aventis).

### **2.3. Materiales para los estudios inmunohistoquímicos: estudio de la masa beta, alfa, proliferación y transcripción**

- PBS (Tampón fosfato salino, pH 7.2-7.4).
- Triton X-100 (ReagentPlus<sup>®</sup>, Sigma Aldrich, Co, St Louis, MO, USA)
- STF - Fetal Bovine Serum 5% (ReagentPlus<sup>®</sup>, Sigma Aldrich, Co, St Louis, MO, USA)
- DABCO (ReagentPlus<sup>®</sup>, Sigma Aldrich, Co, St Louis, MO, USA)
- DAPI (ReagentPlus<sup>®</sup>, Sigma Aldrich, Co, St Louis, MO, USA)
- Tampón Citrato (pH 6.0)
- Medio de montaje anhidro Entellan<sup>®</sup> (Merk-Milipore, Darmstadt. Germany).
- DAB (3-3'-diaminobencidina) (Sigma-Aldrich, MO, USA).
- Hematoxilina de Harris (Biopack<sup>®</sup>, Biopack S.A. Buenos Aires, Argentina).
- Eosina (Biopack<sup>®</sup>, Biopack S.A. Buenos Aires, Argentina).
- Bicarbonato cálcico (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).
- Anticuerpo de ratón IgG monoclonal antiinsulina (Abcam, Cambridge, CB4 OFL UK).

- Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fluoróforo Alexa 546 (Molecular Probes™, Eugene, OR, USA).
- Anticuerpo IgG policlonal de conejo anti-PCNA (Abcam, Cambridge, CB4 OFL UK).
- Anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con fluoróforo Alexa 488 (Molecular Probes™, Eugene, OR, USA).
- Anticuerpo IgG de conejo anti-Pdx-1 (Abcam, Cambridge, CB4 OFL, UK)
- Anticuerpo IgG de cabra anti-IgG de conejo conjugado con fluoróforo Alexa 488 (Molecular Probes™, Eugene, OR, USA)
- Anticuerpo de ratón IgG monoclonal antiglucagón (Abcam, Cambridge, CB4 OFL, UK).
- Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con fluoróforo Alexa 546 (Molecular Probes™, Eugene, OR, USA)
- Anticuerpo de conejo IgG monoclonal anti-Arx (Abcam, Cambridge, CB4 OFL UK)

### **3. Métodos experimentales**

#### **3.1. Grupos de estudio**

En nuestro estudio se establecieron dos grupos experimentales que se mantuvieron bajo las mismas condiciones ambientales, tanto en los estadios pre-, intra- como postoperatorios. Son los siguientes:

- Grupo Sham o Control quirúrgico
- Grupo quirúrgico sometido a Transposición Ileal Preduodenal (PDIT)

Los animales se mantuvieron en un ambiente con ritmo circadiano similar al fisiológico; evitando a toda costa el estrés externo mediante la reducción de

manipulaciones al menor número posible de colaboradores; manteniendo una dieta normal con pienso estándar (suministrado por el SEPA) salvo en los estadios preoperatorios, siendo sometidos a 24 horas de ayuno previo en jaulas adecuadas. Posteriormente se les administró una dilución de 200 mg ibuprofeno (Dalsy<sup>®</sup> 20mg/dl) en agua durante las primeras 24 horas tras la intervención quirúrgica.

De igual manera durante los tres días posteriores a la cirugía, la dieta fue modificándose, pasando de dieta líquida a base de batidos hiperproteicos (Resource Protein<sup>®</sup>) diluidos al 50 % V/V a la dieta estándar, con objeto de limitar los problemas de tránsito al igual que favorecer la cicatrización de las anastomosis realizadas durante la intervención quirúrgica.

El número total de animales en el estudio fue de 30 (n = 30) dividido en dos grupos de quince roedores (n=15). La distribución de cada sujeto a su grupo correspondiente fue al azar.

Antes de realizar cualquier tipo de intervención en los animales pertenecientes a los grupos a estudio, los encargados de la cirugía nos sometimos a un periodo de entrenamiento, con la intención de pulir aspectos técnicos y determinar los distintos límites y referencias anatómicas a aplicar en todos los animales del estudio.

La mortalidad postquirúrgica de los animales fue menor al 37%. La supervivencia en todos los grupos se mantuvo durante ocho semanas tras la intervención, tiempo en el que se realizaron las pruebas funcionales: sobrecargas orales de glucosa, (SOG), estudio de las glucemias e insulinemias. Tras esto fueron sacrificados para posterior estudio de las muestras.

### 3.2. Técnica quirúrgica

Previo a la intervención, los sujetos de estudio fueron anestesiados con gas (isoflurano). La inducción se realizó impregnando una gasa con el gas anestésico que depositada en un recipiente estanco dentro del cual se introducían a los animales. Este paso siempre se realizó bajo campana extractora para evitar la inhalación accidental por parte del personal de investigación.

Una vez anestesiado, el animal era conectado a una bomba de ventilación continua unida a su vez a una mascarilla que incluía el hocico y la boca, a través de la cual se le administraba isoflurano (1-3% V/V) dependiendo del tiempo requerido de cirugía. De esta forma se lograba mantener el efecto de la anestesia durante la intervención quirúrgica.

Para mantener una temperatura corporal idónea y evitar la hipotermia resultante de la exposición de la cavidad abdominal, se mantuvo una fuente de calor bajo el animal (manta térmica).

En definitiva, se trataron de reproducir las condiciones externas en el mayor grado posible durante la fase quirúrgica, a fin de reducir la mortalidad operatoria y eliminar los sesgos que pudieran interferir en la interpretación de los datos.

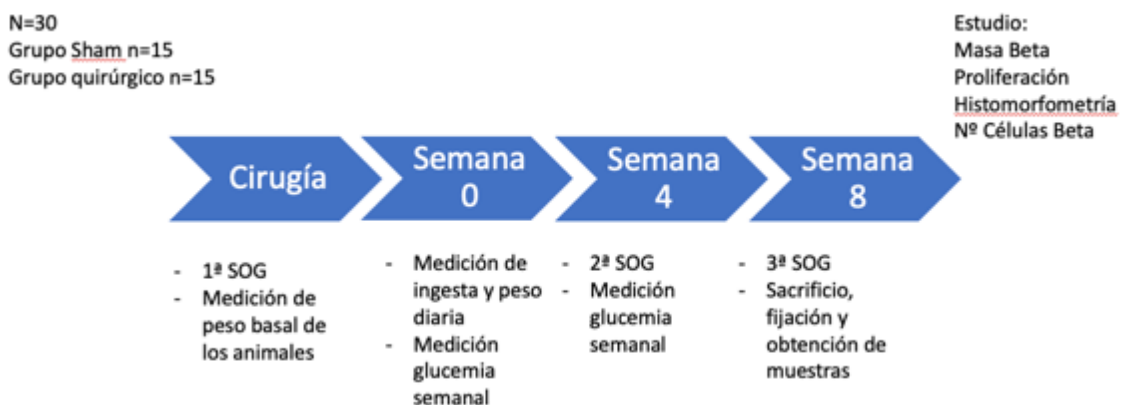


Figura 18. Organigrama de las ocho semanas de observación tras la intervención quirúrgica inicial.

La intervención se lleva a cabo posicionando al animal en decúbito supino, con fijación de las cuatro extremidades. A la piel del abdomen se le aplicó solución antiséptica (clorhexidina tópica); sin rasurado previo se llevó a cabo una pequeña laparotomía media de unos 2-3 cm en el tercio medio de la línea media abdominal.

A continuación se procedió a la evisceración de todas las asas de intestino delgado de manera anatómica en forma de abanico de manera ordenada con la ayuda de pinzas atraumáticas, para conseguir medir en centímetros (cm) el intestino delgado comprendido desde el ángulo de Treitz hasta la válvula ileocecal mediante el uso de cinta métrica.

### 3.2.1. Grupo control o Sham

A los animales pertenecientes al grupo Sham, al tratarse del control quirúrgico, se les realizó una sección transversal completa del intestino delgado, sin resección asociada. Esta se llevó a cabo aproximadamente en el punto medio del intestino delgado que interesa, entre el yeyuno e íleon. La anastomosis de las asas se hizo termino-terminal mediante sutura con puntos sueltos de material de 4/0 (Vicryl®).

Tras esto se suministraron 15 c/c de suero fisiológico a temperatura corporal (35° C) dentro de la cavidad abdominal y las asas de intestino se reintrodujeron en la misma. El cierre de la pared abdominal fue en un solo plano incluyendo piel con sutura continua con hilo de 2/0 (Vicryl®).

### 3.2.2. Grupo quirúrgico: Transposición ileal Preduodenal (PDIT)

Los animales del grupo quirúrgico fueron colocados y preparados al igual que los del grupo Sham. Se realizó incisión bisubcostal previa limpieza de la pared



con clorhexidina, a través de la cual se evisceró todo el intestino delgado, así como el ciego. El estómago se movilizó para una mejor exposición tras liberarlo del epiplón menor.

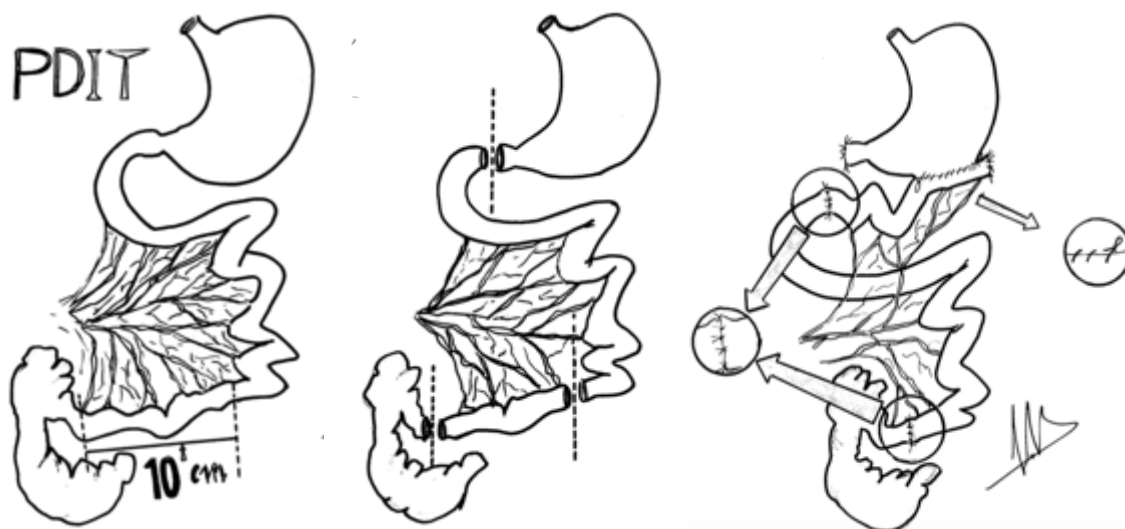


Figura 19. Esquema explicativo de la técnica quirúrgica experimental denominada PDIT, donde se identifica el segmento de íleon terminal, así como la localización anatómica involucrados en la transposición intestinal. Del mismo modo se pueden observar las anastomosis realizadas.

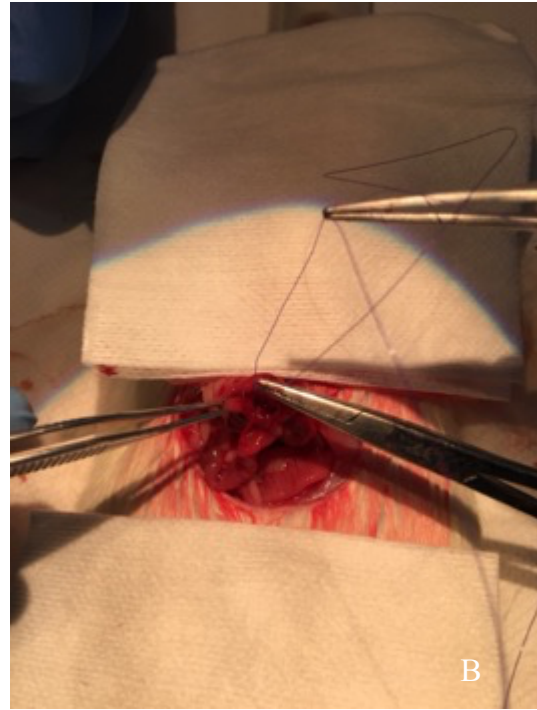
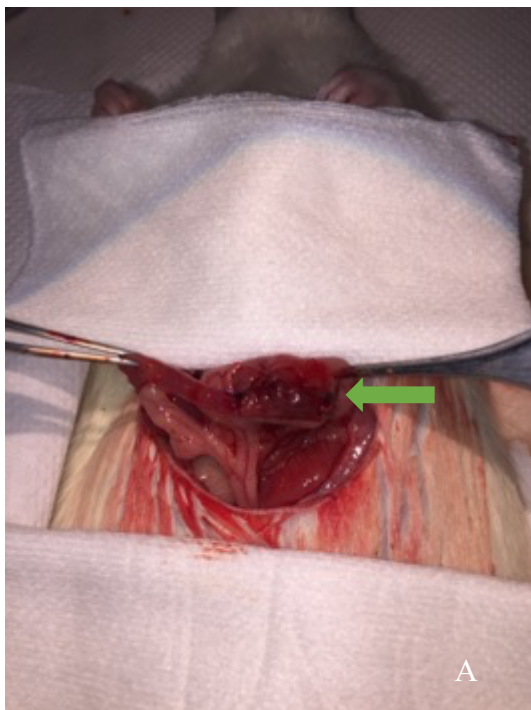
Se midieron los últimos 10 centímetros del íleon terminal (a 1 centímetro de la válvula ileocecal) con sección de éste en ambos extremos, preservando su vascularización.

A continuación, se practicó una sección transversa postpilórica y sutura continua del muñón proximal duodenal con polidioxanona (PDS 5/0). El cabo distal duodenal se anastomosó con el distal del íleon translocado (puntos sueltos de PDS 5/0). El extremo proximal del íleon se unió a la cara posterior gástrica con dos hemisuturas continuas de polidioxanona previa apertura del epiplón mayor. La última anastomosis realizada fue la yeyuno-ileal configurada con puntos sueltos del mismo material.

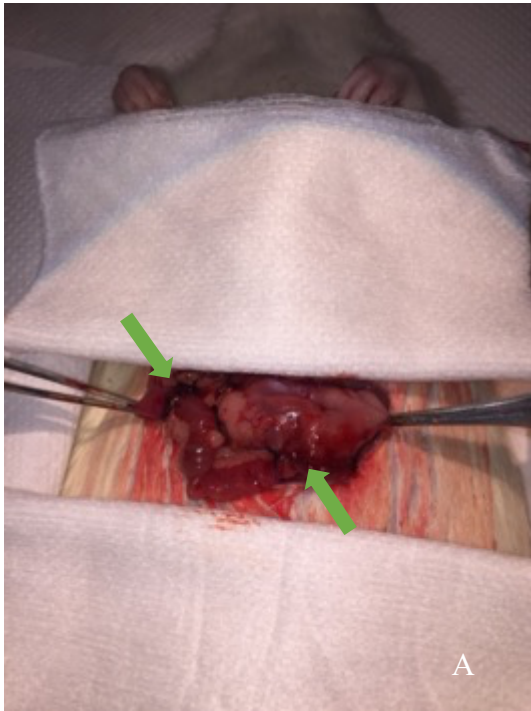
Para finalizar se procedió a la reintroducción de las vísceras a la cavidad administrando 15 cc de suero fisiológico a 35° C y sutura continua en bloque de la pared abdominal con material del 2/0 (Vicryl®).



Panel fotográfico 2. En la imagen A identificamos la laparotomía bisubcostal. En la imagen B se identifica el segmento de íleon a transponer.



Panel fotográfico 3. En la imagen A se identifica anastomosis gastroileal. La imagen B fue tomada durante la confección de la anastomosis ileoduodenal.



Panel fotográfico 4. En la imagen A se identifican ambas anastomosis supramesocólicas confeccionadas. En la imagen B se observa el cierre laparotómico.

#### **4. Determinaciones funcionales**

##### **4.1. Ingesta e incremento de peso**

La ingesta y el peso de los animales se midieron diariamente durante el primer mes tras la cirugía mediante el control de la cantidad de pienso administrado a los animales. Éste fue pesado en una báscula, administrando 150 g por animal y día. El pienso remanente a las 24 horas era cuantificado y se restaba a los 150 g iniciales y de esa forma se obtenía el pienso ingerido por el animal el día previo.

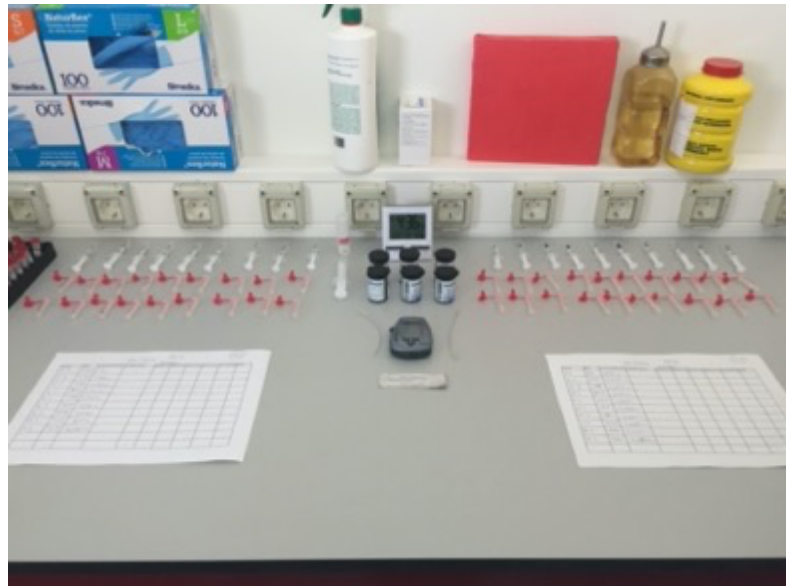
En cuanto al peso del animal, se utilizó una báscula y una jaula vacía. Tarando la jaula antes de la medición de cada animal. Tras las primeras cuatro semanas, estas mediciones se realizaron de forma semanal hasta cubrir un seguimiento total de ocho semanas. Ambos parámetros se midieron en gramos (g).

#### 4.2. Determinación de la glucemia basal

Se realizaron mediciones semanales y siempre en la misma franja horaria (primera hora de la tarde). La medición se hizo mediante glucómetro y tiras reactivas calibradas específicas según instrucciones del fabricante. La sangre, alrededor de unos 2 ml, se obtuvo de la cola del animal mediante punción de ésta con lanceta estéril. Los resultados se expresaron en mg/dl.

#### 4.3. Test de sobrecarga oral de glucosa

A lo largo del estudio realizamos dos pruebas de tolerancia a sobrecarga oral de glucosa (SOG), a las 4 y 8 semanas tras la cirugía. En cada uno de ellos los animales ayunaron 24 horas antes. Se cuantificó el peso de cada rata y la glucemia basal y se suministró, mediante



Panel fotográfico 5. Material utilizado en la realización de la sobrecarga oral de glucosa (SOG).

sondaje orofaríngeo, el suero glucosado en una proporción de 2 g de glucosa por Kg de peso del animal.

Posteriormente se midió la glucemia a los 15, 30, 60 y 120 minutos tras la sobrecarga y se realizó también la recogida de sangre de la vena de la cola mediante punción para el estudio posterior de insulinemia basal y a los 15 minutos tras la sobrecarga.

#### 4.4. Sacrificio y preparación de las muestras

Ocho semanas tras los procedimientos quirúrgicos, todos los animales fueron sacrificados. Para su sedación, y en consonancia con la normativa vigente (Real Decreto 1201/2005, sobre Protección de los Animales Utilizados para Experimentación y otros Fines Científicos), se recurrió a sedación controlada hasta objetivar finalmente el estado de inconsciencia del animal.

Una vez inconsciente, se realizó una laparotomía en cruz abdominal asociando una toracotomía paraesternal derecha e izquierda con exposición amplia del mediastino y el corazón. Para evitar la coagulación durante el procedimiento del compartimento intravascular se inyectó 3 UI de heparina BPM (Clexane® 4000 UI) en el ventrículo izquierdo. Posteriormente, y aún en ritmo sinusal, se introdujo en el ventrículo izquierdo un catéter de 14 French hasta la aorta ascendente a través del cual se perfundieron unos 100 ml de PBS para eliminar todo resto de sangre del circuito arteriovenoso. Tras lo cual se perfundieron 200 ml de líquido fijador de Bouin, conformado por 75% de una solución de ácido pícrico en agua (1% P/V) y paraformaldehído (37% P/V) para



Panel fotográfico 6. Laparotomía y toracotomía en rata sacrificada.

prefijar los tejidos que posteriormente se extraerán. Para ello se usó una bomba de perfusión en ciclos de presión fisiológica y pulsátil de forma que los tejidos no sufrieran ningún daño.

Tras la perfusión y prefijación, se realizó la extracción de los páncreas en bloque, limpiándolos de restos de tejido

conectivo, grasa, ganglios y adherencias varias. Los órganos fueron secados y pesados en una báscula de precisión. La fijación posterior se realizó por inmersión durante 12 horas en solución de paraformaldehído al 37% P/V a 4° C, con idea de asegurar la correcta fijación.

Las muestras fijadas se deshidrataron en soluciones de etanol crecientes desde 70° hasta etanol absoluto y posteriormente xilol. Una vez totalmente deshidratadas, se incluyeron en bloques de parafina para histología con punto de fusión media (57° C) (Histoplast®).

Los bloques de parafina obtenidos se ordenaron, etiquetaron y clasificaron de modo que ulteriormente pudieran ser cortadas en micrótopo en secciones de 10 micras.



Panel fotográfico 7. Páncreas de roedor sacrificado.

## **5. Determinaciones tras el sacrificio**

### **5.1. Estudio de masa celular beta y área media de islotes**

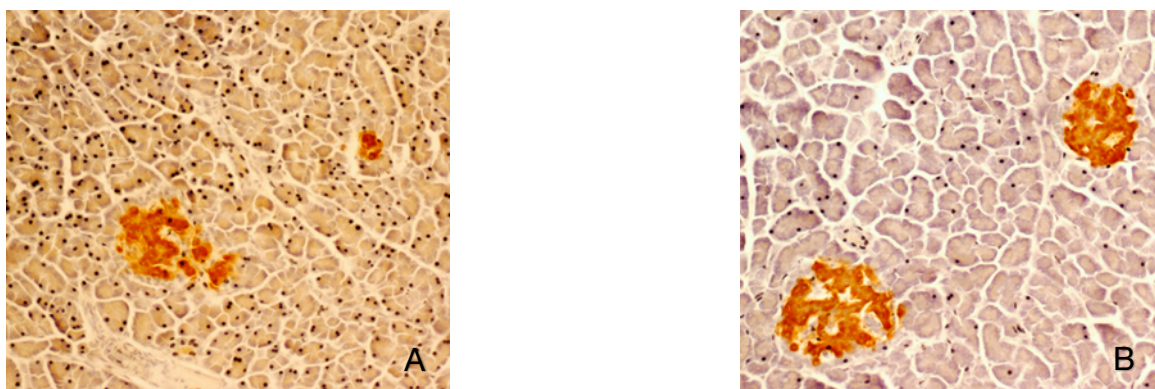
Para el estudio histomorfométrico, secciones completas de páncreas se rehidrataron con pasos progresivos de 5 minutos, en xilol y etanol en concentraciones decrecientes (de 96° a 70°) y posteriormente con PBS. Se usó un baño en Triton X-100 al 0,02% P/V a temperatura ambiente durante 30 min para facilitar la permeabilidad de las membranas celulares.

Tras este paso, se usó un bloqueo de STF al 5% para poder posteriormente incubar la muestra con un anticuerpo IgG monoclonal de ratón anti-insulina

(Abcam, Cambridge, CB4 OFL UK ) 12 horas a 4° C según las instrucciones del proveedor. El revelado se obtuvo mediante incubación con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con un fluoróforo Alexa 546 (Molecular Probes™, Eugene, OR, USA) durante una hora a temperatura ambiente. Por último, los núcleos celulares fueron teñidos con 4'-6'Diamino fenilindol (DAPI) en medio de un montaje DABCO (1:1000 V/V).

El recuento del área insulina positiva y el área total pancreática se realizó a doble ciego con ayuda de un microscopio óptico (40x) y una cámara digital Olympus® DP71 acoplada, que asocia un escáner de imágenes Nikon Super Coolscan con el software para tratamiento de imágenes (Image J).

Los datos obtenidos se expresaron como mg de masa celular beta según la expresión: (Área insulina positiva/Área total páncreas) x peso páncreas.

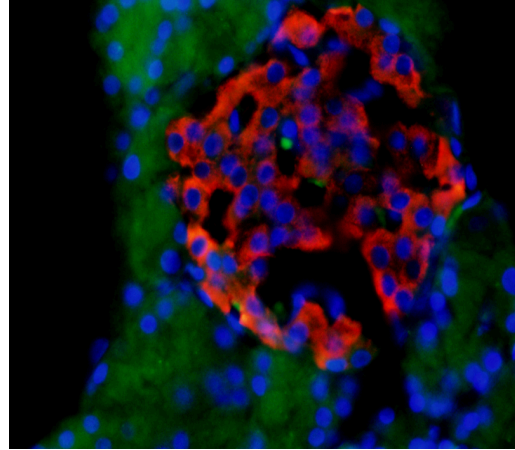


Panel fotográfico 8 donde se identifican células del islote y gránulos de insulina revelados con fluoróforo Alexa 546 como se describe previamente. La fotografía A corresponde a muestra de grupo Sham, mientras que B corresponde al grupo PDIT. Núcleos de celulares teñidos con DAB.

## 5.2. Estudio de proliferación en población beta

Se cuantificó la presencia del marcador de proliferación PCNA, el cual forma parte de la maquinaria de replicación en los islotes pancreáticos.

Una vez rehidratadas y permeabilizadas las muestras de la manera descrita anteriormente, se sometieron a un proceso de desenmascaramiento antigénico mediante calor y variación del pH, sumergiendo las muestras en solución de tampón citrato pH 6.0 a 90°C, en tres tandas de 7 min.



Panel fotográfico 9 donde se identifica islote pancreático con granulos de insulina revelados con fluoróforo Alexa 546 (rojo), entre los cuales se aprecia célula replicándose que se revela con fluoróforo Alexa 488 (verde).

Posteriormente, las muestras fueron teñidas con anticuerpo IgG policlonal anti-PCNA de conejo (Abcam, Cambridge, CB4 OFL UK) y un anticuerpo anti-insulina IgG monoclonal de ratón (Abcam, Cambridge, CB4 OFL UK) incubados durante 12 h a 4°C. Al día siguiente el revelado se realizó durante 1 h con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con un fluoróforo Alexa 488 y un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con un fluoróforo Alexa 546 (Molecular Probes™, Eugene, OR, USA). La contrateñición de sus núcleos se realizó según la técnica previamente descrita.

Así mismo las muestras obtenidas tras esta tinción se examinaron de la manera y con el microscopio y equipo asociado también descrito en el apartado anterior.

Los resultados fueron expresados como: Número de células PCNA positiva /Área insulina positiva en mm<sup>2</sup>, valorándose un mínimo de 15 islotes pancreáticos elegidos al azar en cada punto a estudio.

### **5.3. Estudio de neogénesis en población beta (transcripción beta)**

En este caso, se analizó la presencia del factor de transcripción Insulin Promoter Factor (IPF-1), también conocido como Pancreatic and duodenal



homeobox 1(Pdx-1). Se trata de un marcador de diferenciación para el estudio de células beta originadas desde células ductales o stem-cells.

Los procesos de rehidratación, permeabilización y desenmascaramiento antigénico fueron iguales que en las determinaciones previas. Tras enfriar las muestras durante 15 minutos y el posterior lavado, se procedió a su incubación que se realizó con un anticuerpo IgG monoclonal de conejo anti-Pdx-1 (Abcam, Cambridge, CB4 OFL UK) y un anticuerpo anti-insulina IgG monoclonal de ratón (Abcam, Cambridge, CB4 OFL UK ) como contratinción, ambos incubados durante 12 h a 4°C.

Para el revelado posteriormente se incubó durante 1h a 25° C con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con un fluoróforo Alexa 546 y un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con un fluoróforo Alexa 488, (Molecular Probes™, Eugene OR USA).

La tinción de sus núcleos se realizó según la técnica previamente descrita con DAPI.

Así mismo las muestras obtenidas tras esta tinción se examinaron de la manera y con el microscopio y equipo asociado descrito en el apartado anterior.

Los resultados fueron expresados como: Número de células Pdx-1 positivas / Área insulina positiva en mm<sup>2</sup>. Valorándose un mínimo de 15 islotes pancreáticos elegidos al azar en cada punto a estudio.

#### **5.4. Estudio de masa celular alfa**

Del mismo modo que con la población beta, para el estudio de la masa alfa del islote pancreático recurrimos a secciones completas de páncreas que de igual forma se rehidrataron con pasos progresivos de 5 minutos, en xilol y etanol en

concentraciones decrecientes (de 96° a 70°) hasta finalmente obtener una muestra hidrófila con PBS. Se usó un baño en Triton X-100 al 0,02% P/V a temperatura ambiente durante 30 min para obtener una correcta permeabilidad celular y se bloqueó con STF al 5%.

Tras estos pasos que son superponibles a los realizados con anterioridad para el estudio de la masa celular beta, las muestras se incubaron con un anticuerpo IgG monoclonal de ratón anti-glucagón (Abcam, Cambridge, CB4 OFL, UK) 12 horas a 4° C, según las instrucciones del proveedor. El revelado se obtuvo mediante incubación con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con un fluoróforo Alexa 546 (Molecular Probes™, Eugene, OR, USA) durante una hora a temperatura ambiente.

Por último, los núcleos celulares fueron teñidos con 4'-6'Diamino fenilindol (DAPI) en medio de un montaje DABCO (1:1000 V/V).

El recuento del área glucagón positiva y el área total pancreática se realizó a doble ciego con el mismo microscopio y software de imagen usado con anterioridad.

Los datos obtenidos se expresaron como mg de masa celular alfa según la expresión:  $(\text{Área glucagón positiva} / \text{Área total páncreas}) \times \text{peso páncreas}$ .

### **5.5. Estudio de proliferación en población alfa**

En cuanto a los procesos de proliferación en la población alfa, el marcador utilizado para su estudio fue el PCNA, como ocurrió con la población beta.

Una vez rehidratadas las muestras como se explica con anterioridad, fueron teñidas con anticuerpo IgG policlonal anti-PCNA de conejo y un anticuerpo de

ratón anti-glucagón IgG monoclonal (Abcam, Cambridge, CB4 OFL UK) incubados durante 12 h a 4°C.

Al día siguiente, el revelado se realizó durante 1 h con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con un fluoróforo Alexa 546 y un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con un fluoróforo Alexa 488 (Molecular Probes™, Eugene, OR, USA).

La contratinción de sus núcleos se realizó tal y como se describe previamente, así como el examen al microscopio y el procesamiento digital de las imágenes.

Los resultados fueron expresados como: Número de células PCNA positiva /Área glucagón positiva en mm<sup>2</sup>, valorándose un mínimo de 15 islotes pancreáticos elegidos al azar en cada punto a estudio.

#### **5.6. Estudio de neogénesis en población alfa (transcripción).**

El análisis del factor de transcripción Aristaless related homeobox (Arx) es un marcador de diferenciación para el estudio de células alfa.

Los procesos de rehidratación y acondicionamiento de la muestra son superponibles a los expuestos previamente.

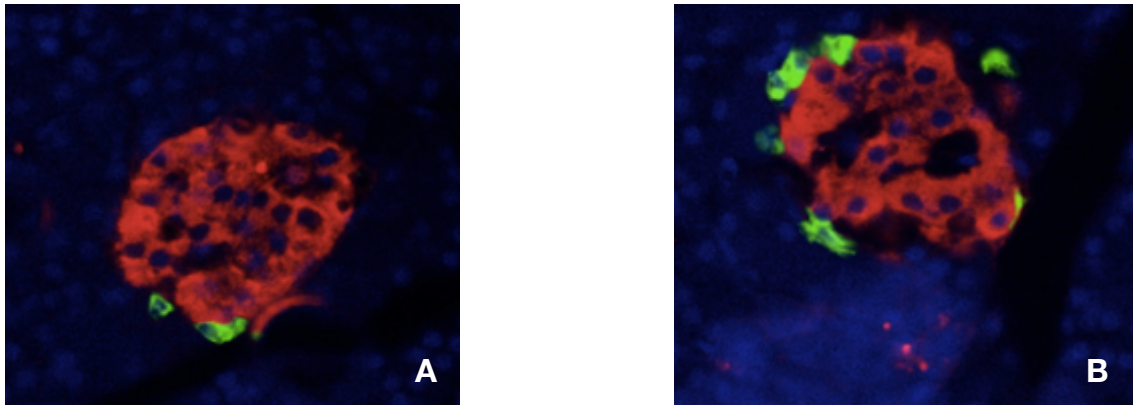
Tras enfriar las muestras durante 15 min, se procedió a su incubación, la cual se realizó con un anticuerpo de conejo IgG monoclonal anti-Arx (Abcam, Cambridge, CB4 OFL UK) y un anticuerpo anti-glucagón IgG monoclonal de ratón (Abcam®, Cambridge, CB4 OFL UK), como contratinción incubado durante 12 h a 4°C.

Para el revelado, posteriormente se incubó durante 1h a 25° C con un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con un fluoróforo Alexa 546

y un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con un fluoróforo Alexa 488. (Molecular Probes™, Eugene, OR, USA). La tinción de sus núcleos se realizó según la técnica previamente descrita con DAPI.

Así mismo, las muestras obtenidas tras esta tinción se examinaron de la manera y con el microscopio y equipo asociado descrito en el apartado anterior.

Los resultados fueron expresados como: Número de células Arx positivas / Área glucagón positiva en mm<sup>2</sup>, valorándose un mínimo de 15 islotes pancreáticos elegidos al azar en cada punto a estudio.



Panel fotográfico 9 donde se identifica la expresión de Arx en el islote pancreático de muestras de ambos grupos de experimentación; el grupo Sham (A) y el grupo PDIT (B). Imágenes tomadas con objetivo x40 sobre tinciones con inmunofluorescencia.

## **6. Análisis de los datos y tratamiento estadístico de los mismos**

Los datos obtenidos en este trabajo han sido expresados como valores medios +/- Error Estándar de la Media (EEM). Dichos datos fueron sometidos a análisis estadístico utilizando el test no paramétrico para muestras no pareadas “U de Mann-Whitney”, con ayuda del programa informático SPSS versión 21.0 tomándose como valores significativos aquellos con  $p < 0.05$  (\*) o  $P < 0.01$  (\*\*).



**CAPÍTULO 4**  
**RESULTADOS**



De acuerdo con lo expuesto en las hipótesis y los objetivos planteados, esta experiencia se centra en el estudio funcional e histológico a nivel pancreático de modelos intervenidos con una técnica experimental de cirugía metabólica (PDIT) frente a los expuestos a una técnica control (Sham). Desde un punto de vista funcional el estudio se centra en los cambios ponderales, en las cifras de insulinemia y en las cifras de glucemia plasmática, tanto basal como tras test de tolerancia oral de glucosa. Histológicamente el estudio muestra los cambios cuantitativos del islote pancreático y en la masa beta y alfa. De igual modo, mediante técnicas de inmunohistoquímica, se han estudiado procesos de proliferación y neogénesis en ambas poblaciones celulares.

Con el fin de facilitar la interpretación de los resultados, estos se han desglosado de la siguiente manera:

- Estudio funcional
  - Estudio de la evolución ponderal
  - Estudio de la glucemia basal
  - Test de tolerancia oral de glucosa
  - Estudio de insulinemia
  
- Estudio histomorfométrico
  - Estudio del área media de islotes
  
- Estudio población beta
  - Estudio de la masa beta pancreática
  - Estudio de proliferación
  - Estudio de neogénesis
  
- Estudio población alfa
  - Estudio de la masa alfa pancreática
  - Estudio de proliferación
  - Estudio de neogénesis



## 1. Estudio funcional

### 1.1. Estudio de la evolución ponderal

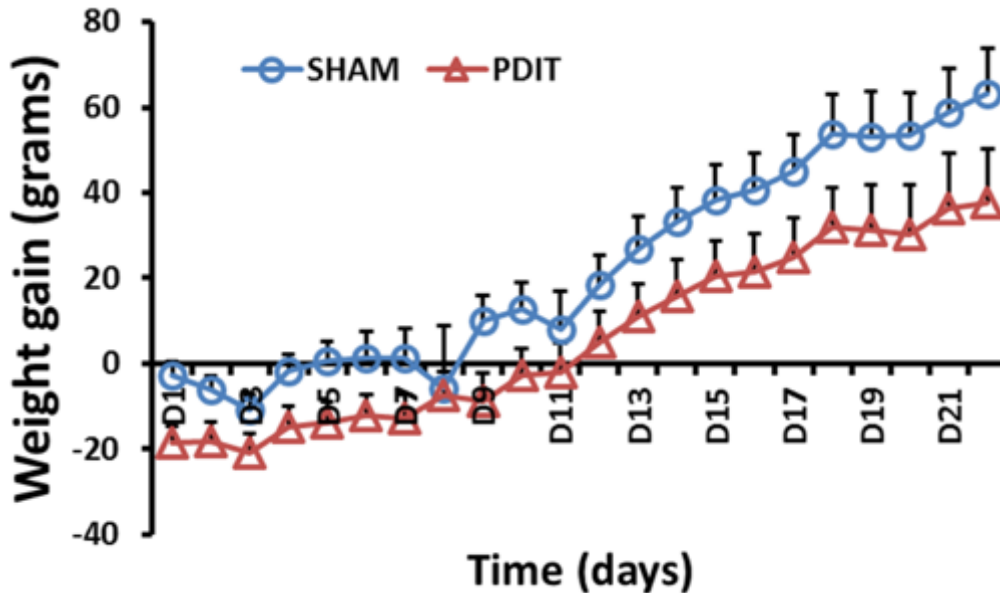


Figura 20. Muestra el peso en gramos (eje Y) y el tiempo en días (eje X).

Tal y como demuestra la Figura 20, el peso de los sujetos demostró diferencias entre ambos grupos desde el principio del estudio. De tal forma, la línea roja, que representa el valor medio  $\pm$  EEM del incremento ponderal del grupo experimental, mostraba un peso inferior al basal que sin embargo comenzó a aumentar y superó al basal a partir del día 11. En el caso de la línea azul, que representa el valor medio  $\pm$  EEM del incremento ponderal del grupo control, la ganancia ponderal comenzó el día 9.

En cualquier caso, al compararse ambos grupos, los sujetos sometidos a la técnica experimental demostraron unos valores menores que aquellos expuestos a la técnica control, aproximándose únicamente en tres días y siempre a expensas de valles en la cuantificación del grupo control.

Al finalizar la experiencia, el grupo control presentaba un peso 60 g superior al que existía al inicio de ésta, mientras que, en el grupo experimental, esa diferencia era de 38 g superior al comienzo del estudio.

Dicha diferencia no ha demostrado significancia estadística, la cual viene determinada por un valor de  $p < 0.05$ .

## 1.2. Estudio de la glucemia basal

En la Figura 21 se visualizan los cambios existentes en ambos grupos en las determinaciones semanales de glucemia basal. En la primera de ellas, tomada a la semana de la intervención quirúrgica, se identifican cifras de glucemia basal superiores en el grupo control, representado en azul. Situación que se revierte a partir del día 14, cuando las cifras de glucemia pasan a ser mayores en el grupo experimental, representado en color rojo.

Dichas diferencias no muestran significancia estadística. En el eje X se expresa el transcurso del tiempo representado en días desde la intervención quirúrgica, mientras que en el eje Y se representa la glucosa basal expresada en miligramos por decilitro (mg/dl). Las barras representan los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo en cada medición.

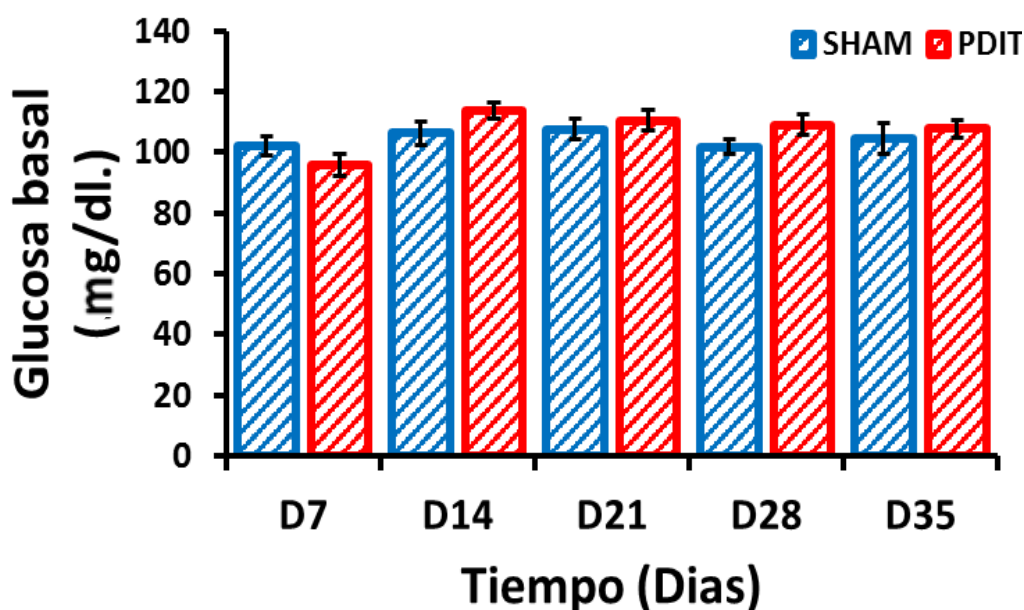


Figura 21. Muestra la glucosa basal en el eje Y y expresada en mg/dl y el tiempo en días en el eje X.

### **1.3. Estudio de la glucemia tras test de tolerancia oral a glucosa**

Las pruebas de sobrecarga oral de glucosa (SOG) se realizaron cada cuatro semanas, obteniendo un total de dos a lo largo del estudio, uno al primer mes tras la cirugía y otro al segundo previo al sacrificio de las muestras. El estudio estadístico se llevó a cabo mediante área bajo la curva (AUC) como complemento a las mediciones aisladas obtenidas durante los distintos tiempos de medición.

En ambas curvas, tanto la obtenida en el primer mes (figura 22A) como en el segundo (figura 23A), los valores son similares, aunque sí se intuyen cifras de glucemia menor en el grupo experimental, representado en ambas gráficas en color rojo, frente al grupo control, representado en color azul.

En el eje de las coordenadas, se representa la glucemia expresada en miligramos por decilitro (mg/dl), mientras que en el de las abscisas, se representa el tiempo en minutos. El diagrama de barras (figura 22B y 23B), representan los valores medios de ambos grupos  $\pm$  EEM.

Estas diferencias entre ambos grupos no presentan significancia estadística, que igualmente viene dada por una  $p < 0.05$ .

Como se identifica en la figura 23A, se intuye una respuesta más eficaz a la sobrecarga oral de glucosa en el grupo experimental, divergiendo ambas curvas en el minuto 60 aunque con una tendencia a aproximar los valores hacia el final de la medición en el minuto 120.

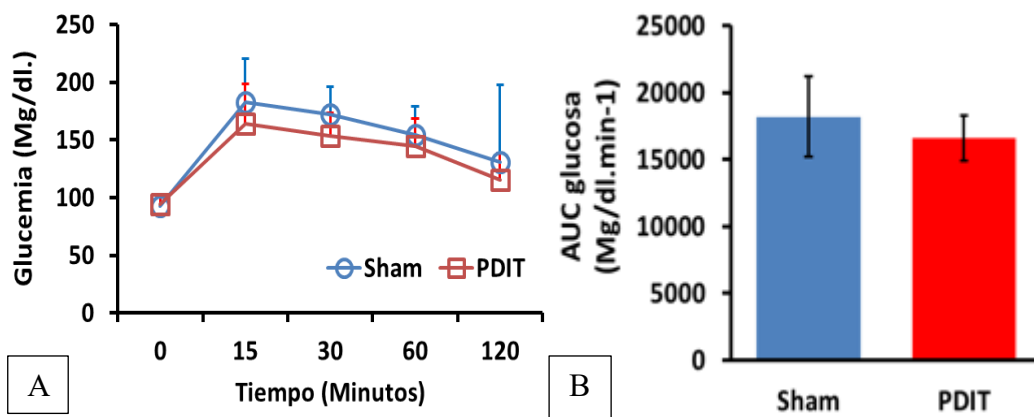


Figura 22. Curva a las 4 semanas de test de SOG, donde en el eje Y se expresa la glucemia en mg/dL y en el eje X el tiempo en minutos. La AUC muestra los valores correspondientes a  $\text{mg/dL}^{-1} \text{min}$  de ambos grupos.

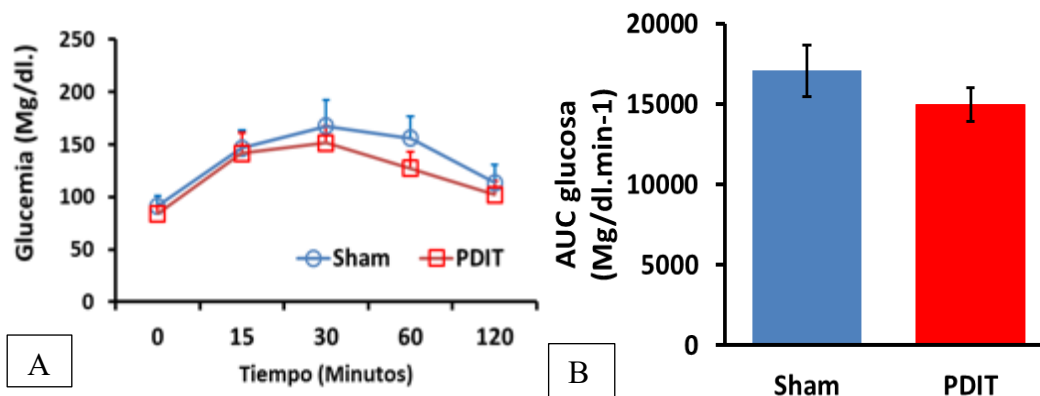


Figura 23. Del mismo modo, en la curva a las 8 semanas del test de SOG, los ejes expresan las mismas variables. La AUC de esta curva expresa la glucemia como  $\text{mg/dl}^{-1} \text{min}$ , sin identificar diferencias significativas, pero sí cierta tendencia a menores cifras de glucemia en el grupo experimental con respecto al control.

#### 1.4. Estudio de insulinemia

El estudio de insulinemia se llevó a cabo junto con las pruebas de sobrecarga oral de glucosa, obteniendo la muestra de sangre de la cola de los sujetos a los 0 y 15 minutos tras la administración a las cuatro y ocho semanas tras la intervención quirúrgica.

En el caso de la insulinemia, sí se identifican diferencias significativas entre la concentración de dicha hormona en los sujetos intervenidos con PDIT y la técnica control o Sham, obteniendo una  $p < 0.05$ .

Las gráficas (figuras 24A y 24C) representan los valores del grupo Sham en azul frente al grupo PDIT en rojo. El eje X representa el tiempo transcurrido en minutos (0 o 15), mientras que el eje Y representa la insulina plasmática expresada en picogramos por mililitro (pg/ml). En los diagramas de barras (figura 24B y 24D) se representan los valores medios  $\pm$  EEM de ambos grupos, en azul corresponde a Sham mientras que en rojo a PDIT.

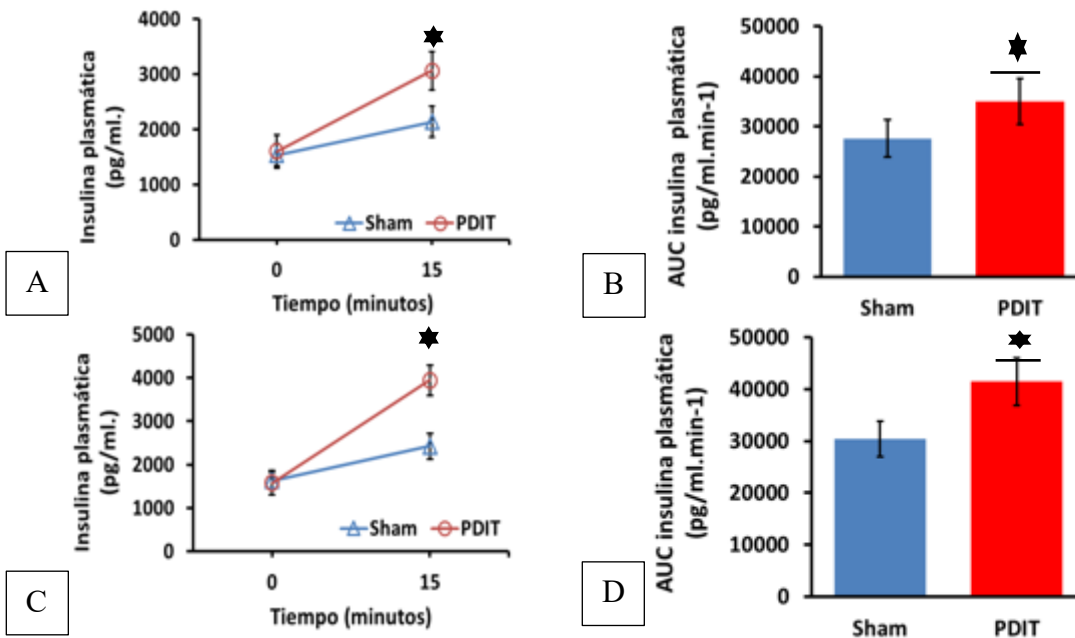


Figura 24A y 24B muestran las concentraciones de insulina plasmática a las cuatro semanas tras la intervención quirúrgica. En la curva (24A) se expresa en el eje Y la insulinemia en pg/ml y en el eje X el tiempo en minutos, mientras que la AUC correspondiente a la misma (24B) expresa la insulina plasmática en  $\text{pg/ml} \cdot \text{min}$ , apreciándose diferencias significativas con una  $p < 0.05$

En las figuras 24C y 24D se identifican las concentraciones plasmáticas de insulina a las ocho semanas tras la intervención quirúrgica donde se aprecian diferencias significativas entre ambos grupos de estudio con  $p < 0.05$ . En la primera gráfica (24C) en el eje X se expresa el tiempo en minutos y en el Y la insulina plasmática en  $\text{pg/ml}$ . En el AUC correspondiente a dicha curva (24D) se expresan las insulinemias de ambos grupos en  $\text{pg/ml} \cdot \text{min}$

## 2. Estudio histomorfométrico

Los cálculos histomorfométricos se han llevado a cabo a través de un microscopio óptico (40x) y una cámara digital Olympus<sup>®</sup> DP71 acoplada que asocia un escáner de imágenes Nikon Super Coolscan, cuyas imágenes se han procesado mediante software especializado (ImageJ).

### 2.1. Área media de islotes

Parece identificarse diferencias significativas entre el área de los islotes pancreáticos de aquellas muestras correspondientes a los individuos sometidos a la técnica experimental (PDIT) frente a los del grupo control (Sham), con una  $p < 0.05$ . Los datos del primer grupo vienen representados en rojo frente al azul que representa al grupo Sham. El eje Y representa el valor medio  $\pm$  EEM del área media del islote expresado en nanómetros cuadrados ( $\mu\text{m}^2$ ). En el eje X se representan ambos grupos de comparación, el grupo control (Sham) o el grupo experimental (PDIT).

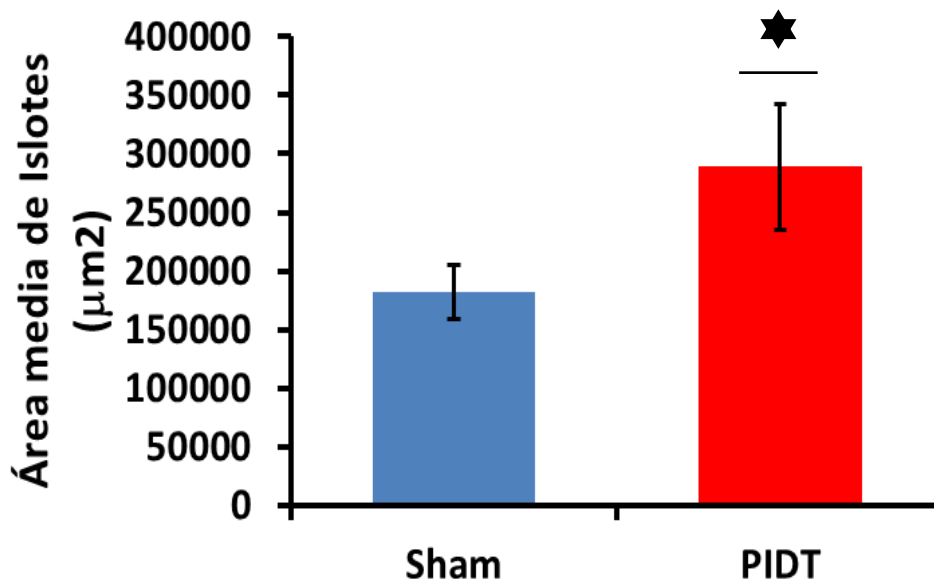


Figura 25. Diferencias significativas con una  $p < 0.05$  en el área media de islotes beta pancreáticos (expresada en  $\mu\text{m}^2$  en el eje Y) entre los dos grupos, experimental (PDIT) y control (Sham).

### 3. Estudio población beta

#### 3.1. Estudio de la masa beta pancreática

De igual modo, se evidencian diferencias significativas entre la masa beta correspondiente a los individuos del grupo experimental frente a los del grupo control, obteniendo una  $p < 0.05$ .

En el diagrama de barras en cuestión (figura 26), en el eje X se representan ambos grupos de estudio, en azul representado el grupo control (Sham) y en rojo el experimental (PDIT). En el eje Y se representa la masa celular beta en miligramos (mg). Ambas barras representan los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo.

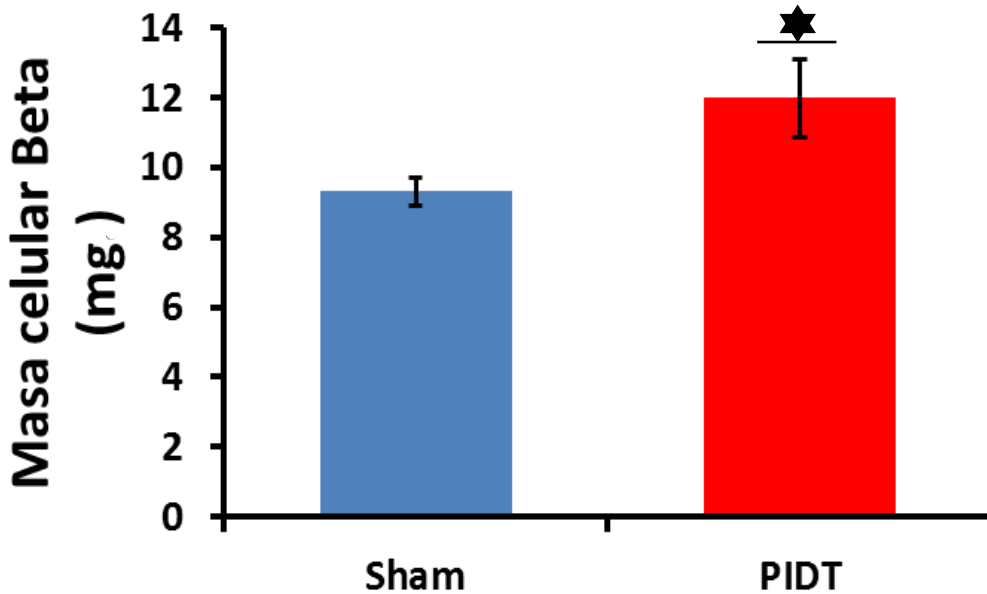


Figura 26. Gráfica donde se aprecia las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la masa celular beta expresada en mg en el eje Y de ambos grupos de estudio.

### 3.2. Estudio de proliferación

En este estudio se vuelve a demostrar la existencia de diferencias significativas entre ambos grupos, demostrando una mayor tasa de proliferación en el grupo expuesto a la técnica experimental (PDIT) representando en rojo con respecto al grupo control (Sham) representado en azul, con una  $p < 0.05$ .

En el diagrama de barras (figura 27), en el eje X se expresan ambos grupos de estudio representando con sendos colores, mientras que en el eje Y se representa el N.º de células PCNA+ dentro del área inmunopositiva a insulina en milímetros cuadrados ( $\text{mm}^2$ ). Ambas barras expresan los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo.

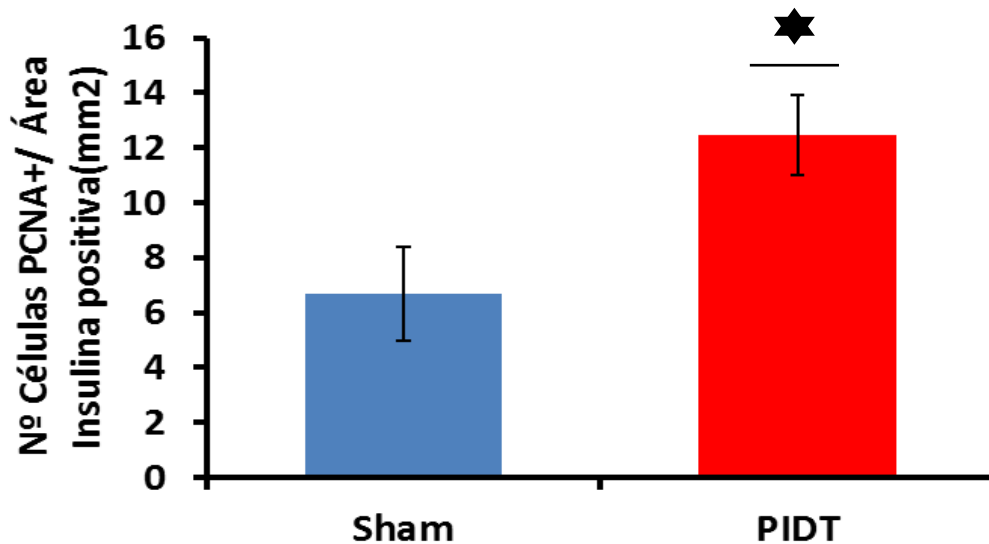


Figura 27. Gráfica que representa las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) identificadas entre ambos grupos en la expresión de células PCNA +, expresadas en el eje Y como Nº de células PCNA + / Área insulina positiva en  $\text{mm}^2$ .

### 3.3. Estudio de neogénesis

En este estudio, el grupo experimental (PDIT) representado en color rojo demuestra cierta tendencia positiva en la tasa de neogénesis en la población celular beta, sin embargo y a diferencia de los procesos de proliferación, en



este caso no muestra diferencias significativas con respecto al grupo control representado en azul, con una  $p > 0.05$ .

El diagrama de barras (figura 28), como los anteriores, muestra en el eje de las abscisas ambos grupos de estudio; mientras que el eje de las coordenadas expresa el número de células Pdx-1 + distribuidas en el área inmunopositivas para insulina expresada en milímetros cuadrados ( $\text{mm}^2$ ). Las barras expresan los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo.

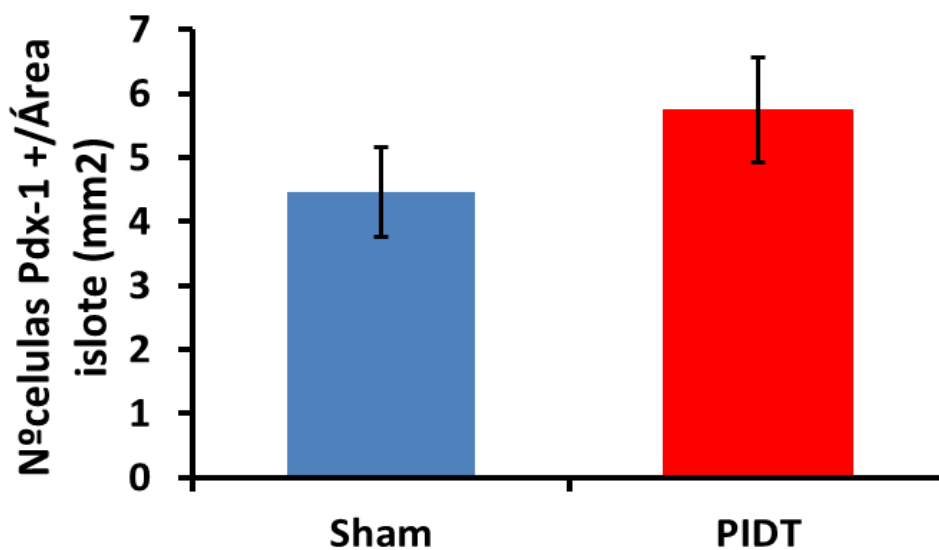


Figura 28. En el eje Y se expresa el Nº de células Pdx-1 + / Área islote en  $\text{mm}^2$ , identificando cierta tendencia a una mayor expresión en el grupo PIDT pero sin presentar diferencias significativas con una  $p > 0.05$ .

#### 4. Estudio de población alfa

Para arrojar luz sobre la repercusión en población celular de linaje alfa pancreático ha sido necesario estudiar tres variables distintas: la masa alfa del total del islote pancreático, el número de células que expresan Arx del total de células del islote y las células en proceso de proliferación del total de células alfa.

De este modo y desglosando cada una de ellas, hemos obtenido los siguientes resultados.

#### 4.1. Estudio de la masa alfa pancreática

Tal y como se muestra en la figura 28, la masa celular alfa presenta cierta tendencia a estar incrementada en el grupo PDIT (representado en color rojo) frente al grupo control (representado en color azul). Sin embargo, la  $p > 0,05$  por lo que no se puede hablar de significancia estadística.

El diagrama de barras muestra en el eje de las coordenadas la masa celular alfa expresada en miligramos (mg). En el eje de las abscisas, se representan ambos grupos de estudio. Las barras representan los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo.

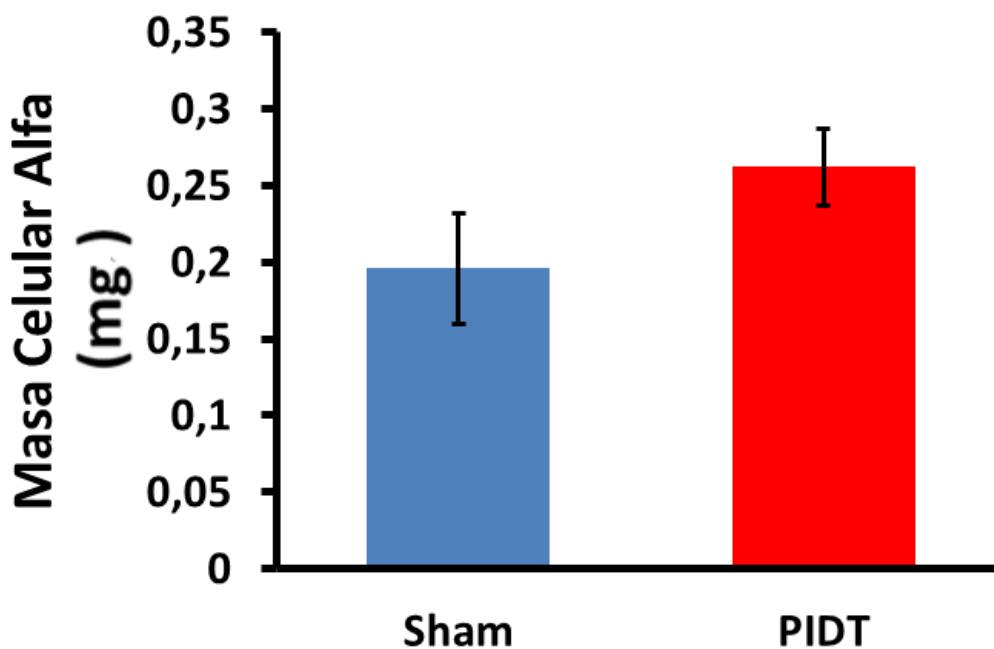


Figura 28. Masa celular alfa (células positivas para glucagón) del total del islote pancreático, donde se aprecia un aumento no significativo en el grupo PDIT frente al control.

#### 4.2. Estudio de neogénesis

Este estudio sí se presenta una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) al comparar ambos grupos. Los grupos vienen representados en el eje X, en color rojo el grupo PDIT frente al azul del grupo Sham. En el eje Y se representa el número de células inmunopositivas para Arx del total del área del islote expresado en milímetros cuadrados ( $\text{mm}^2$ ). Ambas barras representan los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo.

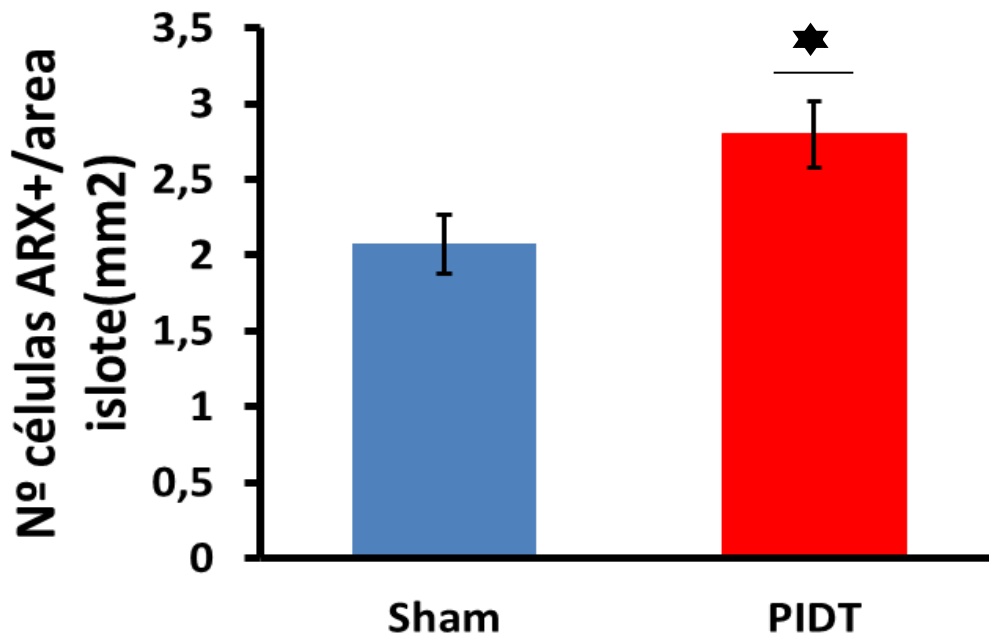


Figura 29. Al comparar la tasa de expresión de Arx en ambos grupos sí se identifican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) a favor del grupo experimental frente al control.

#### 4.3. Estudio de proliferación

En este caso, los resultados expresados de ambos grupos son prácticamente superponibles. La proliferación entre aquellas células positivas para glucagón se ha estudiado mediante la expresión del mismo marcador (PCNA) usado en la población inmunopositivas para insulina.

En este caso, ambos grupos se muestran bastante parejos, e incluso el grupo control presenta valores discretamente elevados con respecto al grupo experimental, aunque sin suponer significancia estadística alguna ( $p > 0.05$ ).

El diagrama de barras representa en el eje de las coordenadas ambos grupos de estudio: el experimental o PDIT representado en rojo, mientras que el control o Sham en azul. El eje de las abscisas representa el N.º de células positivas para PCNA del total del área inmunopositiva para glucagón expresada en milímetros cuadrados ( $\text{mm}^2$ ). Ambas barras representan los valores medios  $\pm$  EEM de cada grupo.

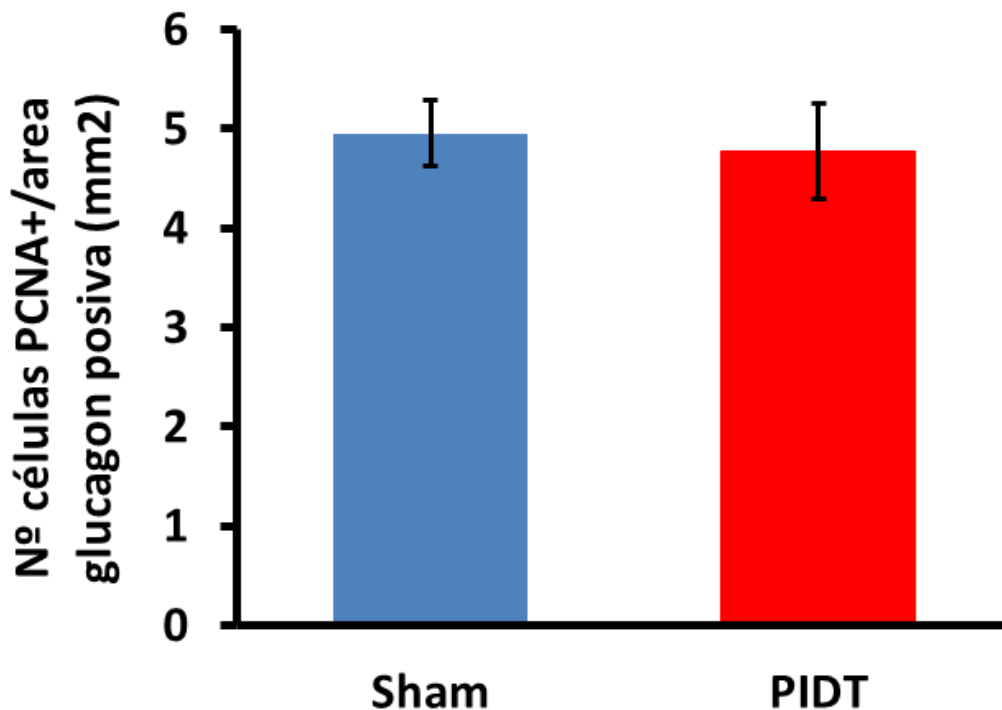


Figura 13. La tasa de proliferación entre la masa alfa de ambos grupos no presenta diferencias significativas en este estudio con una  $p > 0.05$ .



**CAPÍTULO 5**  
**DISCUSIÓN**



Tal y como ya se menciona en la introducción, la diabetes mellitus tipo 2 es una de las patologías generalmente asociadas a la obesidad, y se ha convertido en un importante problema de salud pública durante el siglo XXI, esperando alcanzar en el año 2030 la cifra de 439 millones de enfermos a nivel mundial (136).

Por otro lado, la cirugía metabólica se ha demostrado como el arma más eficaz de las diversas que encontramos en el arsenal terapéutico contra la obesidad y las comorbilidades que se asocian (137). Inicialmente, la mejoría en el metabolismo glucídico se asoció a la pérdida ponderal postquirúrgica, atribuyéndosele a este efecto una mejoría en la sensibilidad a la insulina de los tejidos periféricos.

Sin embargo, en numerosos pacientes esta se producía incluso antes de la pérdida ponderal, lo que llevó a determinar el papel fundamental que ejercen las enterohormonas en este proceso (138, 139). Se evidenciaron a través de sujetos expuestos a un reordenamiento anatómico del tubo digestivo, como la derivación biliopancreática, bypass gástrico o transposición ileal, comparados con aquellos expuestos a una restricción gástrica solitaria (139, 140).

Así, en el intento de describir una técnica quirúrgica que evitara los sesgos derivados de la restricción gástrica y de la pérdida de superficie de absorción asociados a técnicas de bypass, Koopmans y colaboradores desarrollaron en 1981 una técnica quirúrgica consistente en la transposición del íleon terminal a una localización distal al duodeno (141). Más tarde, en 1997, Hickey y colaboradores atribuyeron estos cambios observados al papel fundamental que presenta el duodeno (142), asociando este mecanismo de retroalimentación a la secreción de una hormona con efecto anti-incretínico en el intestino proximal, descrito por Rubino en 2004. Al duodeno históricamente



se le ha otorgado un papel fundamental en la protección del individuo frente a cuadros de hipoglucemia (143).

Recogiendo ese testigo, asumimos que los cambios morfofuncionales de los sujetos vienen condicionados por la respuesta enterohormonal, que a la vez se ve afectada ante un reordenamiento anatómico del tubo digestivo.

En base a ese paradigma, describimos una técnica experimental (PDIT), consistente en la transposición de un segmento de íleon distal a una localización preduodenal, sin excluir el posterior paso a través del duodeno y evitando el efecto valvular que condiciona la función pilórica, dando lugar a un vaciamiento gástrico precoz al íleon distal transpuesto (144).

De tal forma que, los cambios evidenciados en nuestro modelo puedan ser atribuidos al papel fundamental del íleon (145, 146). En ese caso se vería obviado el efecto incretínico que se le atribuye a la exclusión del paso a través del duodeno (142, 143). A la vez nuestro modelo evita el sesgo que supone tanto la restricción gástrica como el componente malabsortivo derivados de técnicas de bypass.

Nuestro estudio, por lo tanto, pretende establecer el comportamiento de la población beta y alfa pancreática a la exposición a dicha técnica descrita. Así como identificar los cambios funcionales derivados, que a la vez condicionan una expresión fenotípica determinada.

La técnica desarrollada en nuestro estudio con carácter meramente experimental no ha sido descrita previamente en la literatura, realizándose, en el caso, la comparación con la técnica más similar desde un punto de vista anatómico, la transposición ileal (IT) clásica o postduodenal, donde el segmento de íleon (10 - 20 cm según los diversos autores) se anastomosa al primera asa de yeyuno proximal tras el ángulo de Treitz (141, 145, 147, 148-153).

Para facilitar la comprensión del lector y la posterior elaboración de conclusiones, en la discusión del estudio valoraremos la expresión fenotípica de nuestro modelo, las variaciones funcionales observadas y el comportamiento histomorfológico de las células del islote pancreático afectadas.

### **1. Sobre la expresión fenotípica. Comportamiento ponderal y de glucemias basales en nuestro modelo**

Como se ha descrito previamente, tanto en los estudios básicos (138-140, 142, 143, 145, 146) como en la práctica clínica, los cambios en el metabolismo glucídico tras las distintas técnicas bariátricas se evidencian antes incluso de que el modelo animal o el paciente presente una pérdida ponderal significativa.

No obstante, este tipo de técnicas (PDIT) carece del componente restrictivo que sí presentan las mayorías de las que se aplican a seres humanos, por lo que no estaría justificada una pérdida de peso significativa en nuestros sujetos.

En este sentido, nuestras ratas fueron sometidas a un control ponderal durante el primer mes tras la intervención quirúrgica, sin apreciarse diferencias significativas entre los animales sometidos a ambas técnicas quirúrgicas. La ganancia ponderal sí sufrió un estancamiento que no perduró más de una semana, periodo que consideramos de recuperación postoperatoria. Tras lo cual los individuos de ambos grupos comenzaron a ganar peso. Este fenómeno se observa en otros estudios similares (154, 155). Estos datos invitan a pensar que este patrón ponderal pudiera estar en relación con el estrés perioperatorio al que se exponen todos los individuos.

Estos resultados contradicen algunos de los estudios relativos a transposición ileal en roedores realizados hasta ahora, que si aportan diferencias

significativas en la ganancia ponderal (147). Si bien debemos tener en cuenta la particular naturaleza de nuestro modelo, que de forma experimental comprende la transposición preduodenal frente a la postduodenal de los modelos citados.

Estas divergencias han sido referenciadas en otros estudios en los que o bien los sujetos a estudio eran obesos y diabéticos (156) o bien ratas de cepas distintas (147, 156, 157).

En aquellos estudios donde sí se aprecian cambios significativos en la ganancia ponderal, éstos son explicados mediante el efecto glucagonotrópico demostrado de hormonas secretadas en las células L como el GLP-2, especialmente en pacientes sanos no diabéticos (158, 159). Estas células L, frente a las K, son más características de segmentos distales del intestino (160, 161), que una vez transpuesto sufre un proceso de “yeyunización” con el consiguiente aumento tanto de la profundidad de vellosidades como del grosor muscular.

Estos cambios vienen, probablemente inducidos por el efecto trófico de enterohormonas como GLP-2 y PYY (segregadas en las células L) (162, 163).

También se dan a nivel celular, identificando un aumento de células K y L en la mucosa ileal transpuesta.

No obstante, asociar la pérdida ponderal a la proximidad del íleon transpuesto parece controvertido dado que más proximal que en la localización propuesta es anatómicamente imposible y, sin embargo, en este estudio esas diferencias no aparecen.

Consideramos que el origen de los hallazgos puede encontrarse en la localización del íleon con respecto al duodeno debido, sobre todo, al efecto tamponador de los jugos biliopancreáticos que en él se secretan.

Por ello y dada la amplia variedad de literatura publicada, es difícil sacar conclusiones definitivas. Para ello se debería estandarizar el diseño de los estudios, con modelos de una misma cepa, expuestos a una técnica quirúrgica similar y con tiempos de observación suficientemente largos.

En cuanto a la glucemia basal, nuestro estudio no muestra diferencias significativas al comparar ambos grupos. Probablemente debido a que la afectación de este parámetro suele darse en estadios avanzados de disfunción del metabolismo glucídico que no es el caso de nuestros animales. Por otro lado, es lo esperable si atendemos a los estudios publicados en la literatura que al igual que nosotros, trabajan con ratas ni obesas ni diabéticas (164). La agresiva técnica quirúrgica no ha impedido que los animales de experimentación tengan recursos pancreáticos y periféricos para alcanzar un equilibrio homeostático para la glucemia.

No se debe pasar por alto el hecho de que la intervención PDIT no presenta un carácter restrictivo ni malabsortivo, sino que el efecto se debe a la transposición ileal a una localización no descrita previamente (144), logrando mantener la longitud original del tracto digestivo en las ratas intervenidas.

Probablemente llevando a una serie de cambios sutiles, con escasa traducción en parámetros groseros como son los niveles basales de glucemia, pero con gran implicación a nivel histomorfométrico e incluso funcional a largo plazo.

## **2. Sobre los hallazgos en pruebas funcionales. Respuesta a la prueba de sobrecarga oral de glucosa y cifras de insulinemia.**

En un intento de determinar esos cambios sutiles en el metabolismo glucídico antes mencionados, nuestros sujetos fueron sometidos a dos pruebas de sobrecarga oral de glucosa a lo largo del estudio (SOG). El primero de ellos registrado al primer mes y previo al sacrificio en el segundo mes. Nuevamente,

los resultados obtenidos al comparar ambos grupos no presentaron significancia estadística, aunque sí cierta tendencia perceptible.

Por el contrario, Mencarelli y colaboradores, en su estudio sí identifican diferencias significativas en todas las mediciones tras la prueba de sobrecarga oral de glucosa. Dichas pruebas se llevaron a cabo en ratas con íleon transpuesto siete meses después de la cirugía y tras tratarlas durante los siete días previos con ácidos biliares (ácido quenodesoxicólico) (146).

Además, en otro estudio llevado a cabo por el equipo de Nausheen et al. en el que se comparan los resultados de una técnica restrictiva (gastrectomía vertical), una técnica de transposición (transposición de 20 cm de íleon distal al Treitz) y una técnica mixta (148), en sujetos sanos tras dos meses de dieta líquida a base de Ensure Plus®, se observó también una intolerancia a la glucosa en todos los casos. En este caso, la discordancia con nuestro estudio asumimos que viene dada por la importante diferencia entre nuestra técnica quirúrgica, -que transpone un segmento de 10 cm de íleon mientras que su segmento transpuesto mide el doble (20 cm)- así como las marcadas diferencias en la alimentación de los animales a estudio.

Con respecto a las cifras de insulinemia, en nuestro estudio sí reportamos una diferencia significativa en la comparativa entre ambos grupos.

Las muestras se obtuvieron a las cuatro y ocho semanas coincidiendo con las pruebas de SOG. De esta forma, se ha trabajado con muestras de sangre de cada animal previa la administración oral de glucosa y a los 15 minutos de ésta.

De esta forma, los sometidos a PDIT presentaron niveles séricos de insulina superiores a los que presentaron los del grupo control. Dicha diferencia se observó tanto a las cuatro como a las ocho semanas tras la intervención quirúrgica.

Fenómenos parecidos se identifican en algunos estudios comparables al nuestro en sujetos sanos y con normopeso, como el llevado a cabo por Strader y colaboradores (149). Estos hallazgos podríamos asociarlos a una elevación en las concentraciones séricas de enterohormonas sintetizadas y secretadas en el íleon terminal como PYY o principalmente GLP-1 (157). Así, es conocido el papel estimulador de la respuesta insulínica de GLP-1 tanto sobre la propia secreción de insulina como sobre la masa celular beta pancreática (165). Lo que nos podría poner en la pista de los mecanismos que desencadenan esta potente respuesta insulínica en nuestro modelo. Esto concuerda también con los datos obtenidos en estudios previos del grupo, pendientes aún de publicación, que en sujetos expuestos a esta técnica quirúrgica determinan un incremento en la secreción de GLP-1(166).

En cualquier caso, parece establecida la capacidad de las técnicas transpositivas de íleon para lograr modificar la respuesta glucídica. Como también confirma otro estudio de Strader, que identifica un pico en la secreción de insulina precoz en el grupo experimental (trasposición ileal clásica) con respecto al control. No obstante, debemos ser cuidadosos cuando valoramos todos estos estudios y tener en cuenta detalles como el diseño de la SOG con distintas concentraciones de glucosa no estandarizadas y el tiempo transcurrido desde la cirugía. Incluso debemos tener en cuenta las distintas cepas de roedores usadas en el caso de los modelos animales.

A modo de resumen se vuelven a plantear las preguntas lógicas que surgen, siendo la primera de ellas, ¿por qué no hay diferencias significativas en la tolerancia glucémica tras la SOG en nuestros animales existiendo importantes diferencias en su respuesta insulínica?

En respuesta a esto no debemos olvidar el papel del glucagón en el balance de la glucemia. Si tenemos en cuenta que nuestro modelo es sano y por lo tanto sin una resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos, esto debería conducir a episodios de hipoglucemia en nuestros animales, que

no parecen haberse dado. Es por tanto que debe existir un mecanismo compensador que podría llevar a cabo el glucagón, estimulando la producción hepática de glucosa. Con una probable relación con la hipersecreción de otras enterohormonas secretadas en las células L ileales como el GLP-1 o GLP-2, ambos con conocido efecto glucagonotrópico, en especial sobre individuos sanos y con normopeso (157, 159, 167).

Si bien por motivos logísticos, económicos y de tiempo en el presente estudio, ésta no ha sido una vía explorada; se nos abre una necesaria vía de estudio.

Sin embargo, trabajos previos en este mismo modelo quirúrgico han determinado como ya hemos dicho una alta expresión y niveles plasmáticos de GLP-1 (166). Esto resulta de especial relevancia si hacemos casos a los estudios que proponen una activación dual del receptor hepático de glucagón (Cgcr), tanto por el propio glucagón como por GLP-1 o el GLP-2, ambos péptidos de la misma familia (159, 167). En este sentido sabemos del efecto inhibitorio de la secreción de glucagón ejercido por la insulina en modelos sanos animales y en humanos (157, 167), lo que sitúa a los péptidos ileales (GLP-1 / GLP-2) como principales candidatos, al menos en nuestro modelo, al mantenimiento de la glucemia en los animales tras una descarga insulínica sobredimensionada.

Finalmente, si nos centramos en el aspecto mecánico, no debemos olvidar que nuestra técnica nunca ha sido descrita previamente. Es posible que los hallazgos sean secundarios exclusivamente a las novedades que aporta frente a la transposición ileal clásica. En nuestro caso, el paso expedito del bolo alimenticio al íleon se hace a través de una anastomosis gastroileal, obviando el efecto valvular pilórico y por ende dando lugar a un vaciamiento gástrico acelerado. Del mismo modo, el paso a través del duodeno ocurre a continuación del íleon, a través de la anastomosis ileoduodenal (144).

Estos cambios, si bien son sutiles, pueden ser también responsables, al menos en parte, de esa elevación de la insulinemia a los 15 minutos tras la SOG. Así, al verse expuesto el íleon terminal a un paso muy precoz y desmedido del contenido gástrico, la secreción de enterohormonas ileales va a ser superior a la descrita en otros estudios. Si el duodeno tiene un papel de contraregulación en este eje enteropancreático como ya describió Rubino et al (143), la exposición duodenal es posterior a esa estimulación precoz e intensa del íleon, por lo que no es suficiente para contrarrestarla y ello supone una elevación de la concentración de péptidos ileales con un pico secundario de la insulinemia a los 15 minutos tras la SOG.

### **3. Sobre los cambios histomorfológicos en el páncreas endocrino**

Otra pregunta que subyace una vez constatados los cambios funcionales en el metabolismo glucídico tras PDIT es la relativa a las posibles afectaciones a nivel histológico del principal órgano encargado en este caso de la secreción de insulina: el páncreas endocrino.

En este sentido, están descritos diversos mecanismos mediante los cuales el páncreas de un modelo expuesto a una técnica quirúrgica bariátrico-metabólica se adapta a las nuevas condiciones que facilitan una mejoría en el metabolismo glucídico, destacando entre ellos los fenómenos de hipertrofia (168), proliferación (153, 169-173), neogénesis (115, 172) y/o transdiferenciación (81). Todos esos mecanismos celulares tendrían un carácter expansivo de la estirpe celular en cuestión; frente a la senescencia y la apoptosis como mecanismos reductores, que no han sido valorados en nuestro estudio.

Se hacía necesario, en las muestras de páncreas de nuestros modelos, testar la existencia de estos fenómenos. A tal efecto hemos empleado técnicas inmunohistoquímicas.



De una forma grosera e inicial la primera parte del estudio del páncreas endocrino de nuestros animales se centró en la histomorfometría de los islotes pancreáticos. Evaluando dos variables en este aspecto: el área media de los islotes pancreáticos y la masa celular, tanto beta como alfa pancreática.

En el caso de la primera, el área media de los islotes, tal y como describimos en los resultados, es significativamente mayor en los páncreas de aquellos animales expuestos a PDIT que en los del grupo control.

Este resultado parece ser coherente si tenemos en cuenta dos aspectos. En primer lugar que nuestro modelo presenta una acusada respuesta insulínica, y que el 80% de las células del islote pancreático son células beta secretoras de insulina en el caso de los roedores (3). No obstante, el tamaño general de los islotes como hemos dicho constituye un parámetro histológico un tanto inespecífico, ya que no descarta cambios en la composición celular del islote derivados de la cirugía y que pudiesen dar lugar a un incremento del islote pancreático a expensas de otros tipos celulares distintos de la población beta (174). En este punto se hizo necesario evaluar la masa celular beta mediante inmunotinción.

Del mismo modo que con el área media de los islotes, en nuestro estudio observamos diferencias significativas en la masa beta pancreática, identificando un incremento en los sujetos expuestos a PDIT frente a los del grupo contrario. Lo cual confirmó nuestras hipótesis iniciales.

No obstante, a la hora de valorar el grado de repercusión de alguna técnica bariátrico-metabólica en la histología del páncreas endocrino, debemos ser prudentes atendiendo al tiempo de supervivencia tras la cirugía. En nuestro caso a los dos meses tras la intervención quirúrgica.

Con respecto al estudio de la masa celular alfa, para una mayor comprensión del lector, discutiré todo lo relativo a esta estirpe celular posteriormente junto con otros parámetros estudiados.

En este apartado y volviendo al tamaño medio de los islotes, una nueva duda se planteó en este caso ¿Cuál es el mecanismo por el cual se incrementa la población celular beta? Si atendemos al aumento en el tamaño de los islotes, todo parece indicar la implicación en ello de fenómenos replicativos. En éstos aparecen nuevas células beta provenientes de células beta preexistentes, lo que justificaría un aumento del tamaño de los islotes frente a fenómenos de neogénesis, en los que, mediante diferenciación celular, aparecen nuevas células beta desde células precursoras originando multitud de pequeños islotes y “clústeres” pancreáticos.

De nuevo, lo anteriormente mencionado solo constituye una prueba indirecta del posible mecanismo involucrado en el incremento de la masa celular beta. Este hecho obligó a la realización de un estudio inmunohistoquímico directo mediante la valoración de la presencia del marcador de proliferación: antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) en la población celular beta. Nuestro planteamiento fue confirmado al aparecer diferencias significativas entre los dos grupos estudiados.

En esta línea, diversos estudios previos llevados a cabo por nuestro equipo de investigación demuestran que tras técnicas de cirugía bariátrico-metabólica se obtienen niveles elevados de GLP-1 en suero (153, 166). Tanto el GLP-1 como su análogo la Exendina-4 (Ex4) han demostrado una importante capacidad para inducir la proliferación de células beta mediante la activación de diversos genes y factores de crecimiento, que se pueden objetivar con la expresión de diversos antígenos como Ki67 o PCNA (169-173). Esto puede justificar perfectamente la respuesta proliferativa encontrada.

Pero GLP-1 no es la única enterohormona que ha demostrado tener cierto carácter proliferativo. Péptidos como el GLP-2 no han sido estudiado en nuestro caso por las dificultades logísticas y económicas, además de las derivadas del uso obligado de reactivos ultraespecíficos a fin de evitar reacciones cruzadas en ELISA que pudiera artefactar la extracción de conclusiones. Tanto GLP-2 como el PYY han demostrado la misma capacidad en otros estudios (170), además de poder actuar sobre población celular alfa (157). Si bien es cierto que en un estudio paralelo pendiente de ser publicado en el que se contemplan los valores séricos de diversas enterohormonas, el PYY no demuestra diferencias significativas con respecto a los sujetos control (166).

Recordando el modelo anatómico resultante tras nuestra técnica experimental (144), el segmento de íleon terminal es anastomosado a la curvatura mayor gástrica, anulando el efecto válvula que tiene el píloro y condicionando un vaciamiento gástrico precoz. De igual forma, ese segmento ileal queda proximal al duodeno.

Teniendo en cuenta estas dos características, podemos intuir que la exposición de la mucosa ileal al bolo alimenticio en nuestro modelo es más intensa al estar el píloro abolido y más precoz al quedar el íleon en disposición más proximal que en transposición ileal clásica. El contenido vertido en íleon tiene un contenido mucho más ácido que en técnicas clásicas, ya que las secreciones biliopancreáticas alcalinas se dan distales en el duodeno.

Estos factores invitan a pensar, por lo tanto, que esa mucosa ileal preduodenal pueda inducir una secreción de GLP-1 más pronunciada incluso de lo identificado en estudios previos, y que sea esa enterohormona circulante la que va a inducir un efecto proliferativo en el páncreas de nuestros animales.

Retomando los mecanismos que subyacen al incremento de la masa celular beta no debemos a priori descartar una participación menor de otros

fenómenos homeostáticos, a pesar de que las pruebas indirectas no sean capaces de identificarlos.

En este punto se procedió a valorar la participación aun parcial de otros mecanismos como la neogénesis / transdiferenciación en la modificación de los islotes presentada por nuestro modelo.

Los procesos de neogénesis se definen por la diferenciación a partir de precursores inmaduros, generalmente presentes en la periferia del islote próximas a los ductos pancreáticos, hacia células diferenciadas con fenotipo en particular (155).

Estos procesos vienen mediados por diversos factores de transcripción, entre ellos de forma destacada Pdx-1 (Pancreatic and duodenal homeobox-1) (173).

En esta línea, el GLP-1, además de tener un papel fundamental en el proceso de proliferación, como hemos demostrado previamente, también se ha relacionado en la literatura tanto con la inducción de la expresión del gen de Pdx-1, como con la regulación de otras dianas de acción de éste como pueden ser el GLP-2 o la proinsulina (173).

Diversos estudios como los desarrollados por el equipo de Yazhou Li o Bernard Portha y colaboradores (172, 165) demuestran una clara relación entre la acción derivada del receptor de GLP-1 y Pdx-1. De esta forma y teniendo en cuenta que los receptores de GLP-1 están presentes en los ductos pancreáticos tanto de roedores como de humanos (165), la exposición a GLP-1 o a su análogo Exendina-4, determina la diferenciación de un número de estas células promotoras inmaduras en células con características beta (insulina-inmunopositivas), con expresión de mRNA para el transportador de glucosa-2 (GLUT-2) y glucoquinasa (115). Este proceso es mediado por la expresión de Pdx-1, por lo que se concluye que dicha expresión es esencial para integrar las señales dependientes del receptor de GLP-1 (172).

No obstante, una vez realizada la evaluación de la expresión de Pdx-1 en los islotes pancreáticos de nuestro modelo y su control, no se apreciaron diferencias significativas entre ambos, lo cual permitió descartar esta vía.

A nuestro favor cabe destacar la limitada participación descrita en la literatura de este fenómeno en la remodelación de los islotes pancreáticos de animales sometidos a cirugía bariátrico-metabólica, que casi se limita totalmente a cirugías de tipo bypass gástrico en animales tanto diabéticos como sanos (174-176) e incluso en humanos (177). Por tanto, tras revisar la bibliografía disponible, se puede intuir que este mecanismo se da de forma generalizada en aquellos procesos que implican a una exclusión duodenal, como el RYGB, o en respuesta a técnicas resectivas pancreáticas. Nuestra técnica, PDIT, no supone ni una ni otra.

No obstante, tal y cómo se ha mencionado en la introducción, los procesos de neogénesis o diferenciación del páncreas han de comprenderse como una red de reacciones interrelacionadas entre sí, particularmente las que repercuten en las poblaciones alfa y beta celular.

Por ello, y tras descartar reacciones de neogénesis celular beta (células insulina inmunopositivas) en nuestros animales, se planteó la posibilidad de estudio de la población alfa. Sobre todo, a partir de los hallazgos llevados a cabo por Bancalero et al, quien identificaron una expansión de la masa celular glucagón inmunopositiva tras la exposición de técnicas bariátricas, concretamente al Sleeve gástrico (SG) (174).

Una vez analizados nuestros resultados cabe destacar un aumento, aunque si bien no significativo, de la masa celular alfa. En nuestro estudio, y a diferencia del comentado de estos autores (174), el sacrificio se llevó a cabo a la octava semana tras la intervención quirúrgica. Esto supone cuatro semanas menos de supervivencia y observación. Es probable que esta diferencia en el periodo de observación, con base a la clara tendencia que muestra el grupo experimental

frente al control, sea suficiente para explicar la ausencia de significancia en nuestro estudio. De haberse prolongado en el tiempo de supervivencia quizás sí habría mostrado una diferencia significativa en el análisis estadístico. La dureza de requerimientos de la técnica quirúrgica de PDIT, que deteriora intensamente al animal propició que decidiéramos un periodo de supervivencia más corto.

No obstante, y pese a no haber observado diferencias en cuanto a masa celular alfa, tras aplicar técnicas de inmunohistoquímica a nuestras muestras podemos mencionar dos consideraciones. Por un lado, al valorar la expresión de PCNA en células positivas para glucagón (células alfa), observamos niveles superponibles entre ambos grupos. Lo que se concluye que los procesos de proliferación parecen no estar implicados.

Dicho hallazgo es compartido con Bancalero et al, en cuyo estudio tampoco se evidenciaba significancia alguna al respecto (174).

Esto obliga a pensar en algún mecanismo alternativo mediante el cual se pudiera ver aumentada la masa celular alfa; que, si bien no es significativo desde un punto de vista estadístico, sí es evidente.

En este sentido, sorprendentemente, sí hemos encontrado diferencias significativas en la expresión de *Arx* (Aristaless related homeobox) entre ambos grupos. Es sabido que dicho marcador está íntimamente relacionado con la diferenciación o neogénesis de células alfa en el islote pancreático, como ha descrito entre otros Collombat et al. (74-76). Su expresión está íntimamente controlada por la expresión de otros marcadores de la familia Pax (*Pax4* y *6*), inductoras de la diferenciación hacia la estirpe beta o delta celular en el islote (73).

Por otro lado, y de forma paralela, los genes *Pdx-1* y *MAFA*, factores que como se ha mencionado con anterioridad participan en la diferenciación hacia

células beta del adulto, tiende a estar disminuido en casos de aumento del estrés oxidativo (embarazo, periodos de ayunas, estrés postquirúrgico) (178).

Esta disminución en la expresión de genes Pdx-1 y MAFA puede ser la responsable de la activación del gen Arx, responsable de la diferenciación celular alfa, a fin de evitar hipoglucemias comprometedoras para la vida (82).

De esta forma y aplicando la compleja cascada de interacciones entre factores de transcripción alfa – beta celulares expuesta en la introducción, una alteración en los complejos represores de la célula beta (Nkx2.2, DNMT3a, Grg3 y HDAC1) redundaría en una disrupción de la transcripción beta y una expresión aberrante de Arx en células beta, ocasionando una transdiferenciación celular de características beta a alfa (82).

No podemos olvidar que la exposición expedita de la mucosa ileal al bolo alimenticio supone un aumento en la secreción de GLP-1, con su efecto proliferativo sobre la masa beta y, por ende, insulinoatrófico. Pero además desde un punto de vista sérico, se han descrito niveles circulantes elevados de otros péptidos como el GLP-2 (157). A diferencia del primero, este tiene un marcado efecto glucagonoatrófico que, si bien no parece traducirse en importantes efectos en roedores no obesos, en aquellos que sí lo son, la eliminación de la señal receptora de esta enterohormona sí altera la respuesta adaptativa del islote en la homeostasis glucídica (158, 159, 179).

Siendo conocedores del volumen de información expuesto con anterioridad y a fin de facilitar la comprensión del trabajo en su totalidad consideramos importante resumir cada uno de los parámetros estudiados.

Con respecto a la expresión fenotípica, nos hemos centrado en la variación ponderal y en las glucemias basales de nuestro modelo, sin objetivar diferencias significativas en ninguno de ambos parámetros. Asumimos que esa ausencia de significancia en gran medida viene dada por las características de los individuos (sanos y en normopeso). En la literatura, si bien hay gran disparidad de resultados, la mayoría de los resultados significativos se dan sobre ratas diabéticas y/u obesas (141, 143, 147, 149, 154).

En cuanto a las pruebas funcionales, en nuestro estudio se realizaron pruebas de sobrecarga oral de glucosa y mediciones de insulinemia a los animales de experimentación antes de la intervención quirúrgica y a las 4 y 8 semanas (previo al sacrificio). En el primero de los parámetros descritos, la prueba de sobrecarga oral de glucosa, si bien se identifica cierta tendencia entre ambos grupos a favor del experimental (PDIT), que sí mostró glucemias menores que el control, no obtuvimos significancia estadística. Aunque en la literatura sí se describen múltiples estudios donde la diferencia es significativa, en nuestro caso, asociamos la ausencia de esta al corto periodo de supervivencia. En estudios similares de nuestro grupo de investigación se han obtenido valores de  $p < 0.05$  a las 12 semanas (153, 175).

Con respecto a la insulinemia, nosotros hemos medido los niveles basales y a los 15 minutos tras la sobrecarga oral de glucosa, obteniendo resultados significativos en ambas mediciones (al cuarto mes y al octavo), a favor de una mayor respuesta insulínica en el grupo PDIT con respecto al control. Esta mayor secreción de insulina la asociamos a una mayor estimulación de la mucosa ileal traspuesta. En otros estudios, la mucosa del íleon traspuesto -recordemos que hasta ahora siempre en localización postduodenal-, presenta modificaciones en su patrón macroscópico y celular, predominando un incremento en la población de células L encargadas de la síntesis y excreción de péptidos como el GLP-1, GLP-2 y PYY (149, 150). Ese incremento en la



secreción enterohormonal tiene un claro efecto insulinoatrópico que se manifiesta con las diferencias significativas descritas.

Con respecto al cambio histomorfológico del páncreas en nuestros sujetos, nos hemos centrado en el estudio de la masa beta y masa alfa pancreática, identificando diferencias significativas en el área media del islote. Si bien la masa alfa se encuentra elevada con respecto al control, no demuestra significancia estadística; a diferencia de los hallazgos en relación con la masa beta pancreática. En otros estudios de este grupo de investigación sí se han dado diferencias significativas en el estudio de la masa alfa, aunque en este caso la técnica quirúrgica era de índole restrictiva y el tiempo de observación postoperatorio fue de un mes más (174). Es probable que, de haber prolongado el tiempo de observación tras la intervención quirúrgica, la masa alfa hubiera mostrado diferencias significativas también, dado que sí se identifica una clara tendencia a su aumento en el grupo experimental.

Estos hallazgos demuestran un efecto estimulante secundario a la trasposición ileal, que no supone componente restrictivo ni malabsortivo alguno, sobre la glándula.

Una vez identificados estos cambios histomorfométricos, usamos técnicas inmunohistoquímicas para determinar la índole de los procesos que subyacen.

El estudio de proliferación demuestra diferencias significativas entre ambos grupos, con una expresión incrementada de PCNA en las células beta. Esta proliferación incrementada se explica fácilmente ante la expresión acentuada de GLP-1, propia de técnicas de trasposición ileal (148, 152). Sin embargo, con respecto a la población celular alfa, la expresión de PCNA no muestra ninguna diferencia entre ambos grupos, por lo que parece oportuno concluir que ese aumento claro, aunque no significativo de masa celular alfa viene determinado por otros procesos ajenos a la proliferación (174).

Los procesos de neogénesis o diferenciación sí parecen darse sin embargo en la población celular alfa, donde se identifica diferencia significativa en la expresión de Arx. Este marcador de diferenciación celular alfa, como describe Collombat, se contraregula de forma exhaustiva con la expresión de factores de transcripción beta como Pdx-1 o genes de la familia Pax.

Una posible causa de este incremento sería el estrés al que son expuestos los sujetos, el cual supone una desregulación del gen Pdx-1 y MAFA, factores de transcripción celular beta, que puede ocasionar una expresión ectópica de Arx y en consecuencia un aumento de la masa celular alfa (82).

Esto podría tener una importancia vital a fin de sobrevivir a una situación que se presupone hipoglucemiante como puede ser el estrés de cualquier índole (178). O concretamente en un contexto como el que exponemos, a modo de respuesta específica ante un aumento deliberado de la población beta a costa de fenómenos proliferativos secundarios a la secreción exacerbada de GLP-1, entre otras enterohormonas, tras exponer a los sujetos a una técnica de transposición ileal.



**CAPÍTULO 6**  
**CONCLUSIONES**



1. Desde un punto de vista fenotípico, tanto la variación ponderal como las glucemias basales no han presentado diferencias significativas, confirmando un modelo experimental útil y estable.
  
2. A nivel funcional, nuestro modelo presenta un incremento en la primera fase de la secreción de insulina, pero es incapaz de modificar la gestión de glucemias respecto a los controles debido a la existencia de mecanismos de contrarregulación pancreáticos.
  
3. Estos hallazgos se deben a procesos adaptativos en el islote mediados por el eje enteropancreático, a través de incretinas y factores de transcripción, activado por la transposición ileal.
  
4. El área media del islote se ve aumentada a expensas de la masa celular beta sin poder descartar la intervención de otros linajes celulares endocrinos.
  
5. La población celular beta se ve incrementada exclusivamente mediante procesos de proliferación.
  
6. Existe un proceso contrastado de diferenciación objetivado por la diferencia significativa en la expresión de Arx indicativo de una etapa temprana de neogénesis hacia el linaje alfa.



**CAPITULO 7**  
**BIBLIOGRAFÍA**





1. Skandalakis, L J et al. "Surgical embryology and anatomy of the pancreas." *The Surgical clinics of North America* vol. 73,4 (1993): 661-97. doi:10.1016/s0039-6109(16)46080-9
2. Olvera-Granados, Claudia Patricia, Leo-Amador, Guillermo Enrique, & Hernández-Montiel, Hebert Luis. (2008). Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina. ¿Regeneración?. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 65(4), 306-324.
3. Dolenšek, Jurij et al. "Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas." *Islets* vol. 7,1 (2015): e1024405. doi:10.1080/19382014.2015.1024405
4. Cleaver, Ondine, and Yuval Dor. "Vascular instruction of pancreas development." *Development (Cambridge, England)* vol. 139,16 (2012): 2833-43. doi:10.1242/dev.065953
5. Leung, Po Sing. "Physiology of the pancreas." *Advances in experimental medicine and biology* vol. 690 (2010): 13-27. doi:10.1007/978-90-481-9060-7\_2
6. Levetan, Claresa. "Distinctions between islet neogenesis and  $\beta$ -cell replication: implications for reversal of Type 1 and 2 diabetes." *Journal of diabetes* vol. 2,2 (2010): 76-84. doi:10.1111/j.1753-0407.2010.00074.x
7. Cabrera, Over et al. "The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 103,7 (2006): 2334-9. doi:10.1073/pnas.0510790103

8. Bramswig, Nuria C, and Klaus H Kaestner. "Organogenesis and functional genomics of the endocrine pancreas." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* vol. 69,13 (2012): 2109-23. doi:10.1007/s00018-011-0915-z
9. Bonner-Weir, S. "Life and death of the pancreatic beta cells." *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* vol. 11,9 (2000): 375-8. doi:10.1016/s1043-2760(00)00305-2
10. Steiner, D F, and A H Rubenstein. "Proinsulin C-peptide--biological activity?" *Science (New York, N.Y.)* vol. 277,5325 (1997): 531-2. doi:10.1126/science.277.5325.531
11. Rorsman, Patrik, and Matthias Braun. "Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets." *Annual review of physiology* vol. 75 (2013): 155-79. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183754
12. Javed, Kiran, and Stephen J Fairweather. "Amino acid transporters in the regulation of insulin secretion and signalling." *Biochemical Society transactions* vol. 47,2 (2019): 571-590. doi:10.1042/BST20180250
13. Mueckler, Mike, and Bernard Thorens. "The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters." *Molecular aspects of medicine* vol. 34,2-3 (2013): 121-38. doi:10.1016/j.mam.2012.07.001
14. Rorsman, Patrik, and Frances M Ashcroft. "Pancreatic  $\beta$ -Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men." *Physiological reviews* vol. 98,1 (2018): 117-214. doi:10.1152/physrev.00008.2017
15. Shaw, Leslie M. "The insulin receptor substrate (IRS) proteins: at the intersection of metabolism and cancer." *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* vol. 10,11 (2011): 1750-6. doi:10.4161/cc.10.11.15824
16. Brereton, Melissa F et al. "Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Co-ordination?" *The journal of*

histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society vol. 63,8 (2015): 575-91. doi:10.1369/0022155415583535

17. Kimball C, Murlin JR. Aqueous extracts of pancreas III. Some precipitation reactions of insulin. *J Biol Chem* 58 (1): 337–348, 1923.

18. Zeigerer, Anja et al. “Glucagon's Metabolic Action in Health and Disease.” *Comprehensive Physiology* vol. 11,2 1759-1783. 1 Apr. 2021, doi:10.1002/cphy.c200013

19. Pieniazek, D et al. “The behavior of hepatic phosphorylase b kinase, phosphorylase a and b after administration of glucagon to patients with glycogen storage disease type VIa.” *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* vol. 18,8 (1986): 546-50.

20. Exton, J H, and C R Park. “Control of gluconeogenesis in liver. II. Effects of glucagon, catecholamines, and adenosine 3',5'-monophosphate on gluconeogenesis in the perfused rat liver.” *The Journal of biological chemistry* vol. 243,16 (1968): 4189-96.

21. Struck, E et al. “Stimulierung der Gluconeogenese durch langkettige Fettsäuren und Glucagon” [Stimulation of gluconeogenesis by long chain fatty acids and glucagon]. *Biochemische Zeitschrift* vol. 343,1 (1965): 107-10.

22. Ui, M et al. “Studies on the mechanism of action of glucagon on gluconeogenesis.” *The Journal of biological chemistry* vol. 248,15 (1973): 5344-9.

23. Garcia, A et al. “Studies on the perfused rat liver. II. Effect of glucagon on gluconeogenesis.” *Diabetes* vol. 15,3 (1966): 188-93. doi:10.2337/diab.15.3.188

24. Rorsman, Patrik, and Mark O Huising. "The somatostatin-secreting pancreatic  $\delta$ -cell in health and disease." *Nature reviews. Endocrinology* vol. 14,7 (2018): 404-414. doi:10.1038/s41574-018-0020-6
25. Lonovics, J et al. "Pancreatic polypeptide. A review." *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)* vol. 116,10 (1981): 1256-64. doi:10.1001/archsurg.1981.01380220010002
26. Sakata, Naoaki et al. "Development and Characteristics of Pancreatic Epsilon Cells." *International journal of molecular sciences* vol. 20,8 1867. 16 Apr. 2019, doi:10.3390/ijms20081867
27. Drott, Carl Johan et al. "Ghrelin in rat pancreatic islets decreases islet blood flow." *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* vol. 317,1 (2019): E139-E146. doi:10.1152/ajpendo.00004.2019
28. Da Silva Xavier, Gabriela. "The Cells of the Islets of Langerhans." *Journal of clinical medicine* vol. 7,3 54. 12 Mar. 2018, doi:10.3390/jcm7030054
29. Soybel, David I. "Anatomy and physiology of the stomach." *The Surgical clinics of North America* vol. 85,5 (2005): 875-94, v. doi:10.1016/j.suc.2005.05.009
30. Mangeat, P et al. "Acid secretion and membrane reorganization in single gastric parietal cell in primary culture." *Biology of the cell* vol. 69,3 (1990): 223-31. doi:10.1016/0248-4900(90)90349-8
31. Prinz, C et al. "Histamine secretion from rat enterochromaffinlike cells." *Gastroenterology* vol. 105,2 (1993): 449-61. doi:10.1016/0016-5085(93)90719-s

32. Kojima, M et al. "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach." *Nature* vol. 402,6762 (1999): 656-60. doi:10.1038/45230
33. Date, Y 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* vol. 141,11 (2000): 4255-61. doi:10.1210/endo.141.11.7757
34. Gualillo, O et al. "Ghrelin, a novel placental-derived hormone." *Endocrinology* vol. 142,2 (2001): 788-94. doi:10.1210/endo.142.2.7987
35. Mori, K et al. "Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin." *FEBS letters* vol. 486,3 (2000): 213-6. doi:10.1016/s0014-5793(00)02308-5
36. Korbonits, M et al. "Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary." *Endocrine* vol. 14,1 (2001): 101-4. doi:10.1385/ENDO:14:1:101
37. Volante, Marco et al. "Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* vol. 87,3 (2002): 1300-8. doi:10.1210/jcem.87.3.8279
38. Pradhan, Geetali et al. "Ghrelin: much more than a hunger hormone." *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* vol. 16,6 (2013): 619-24. doi:10.1097/MCO.0b013e328365b9be
39. Volk, Neil, and Brian Lacy. "Anatomy and Physiology of the Small Bowel." *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America* vol. 27,1 (2017): 1-13. doi:10.1016/j.giec.2016.08.001

40. Mulukutla, Bhanu Chandra et al. "Regulation of Glucose Metabolism - A Perspective From Cell Bioprocessing." *Trends in biotechnology* vol. 34,8 (2016): 638-651. doi:10.1016/j.tibtech.2016.04.012
41. Fu, Zhuo et al. "Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes." *Current diabetes reviews* vol. 9,1 (2013): 25-53.
42. Kalra, Sanjay et al. "Glucocrinology." *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association* vol. 68,6 (2018): 963-965.
43. Leto, Dara, and Alan R Saltiel. "Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4." *Nature reviews. Molecular cell biology* vol. 13,6 383-96. 23 May. 2012, doi:10.1038/nrm3351
44. Roach, P J. "Glycogen synthase and glycogen synthase kinases." *Current topics in cellular regulation* vol. 20 (1981): 45-105. doi:10.1016/b978-0-12-152820-1.50006-7
45. Zhang, Quan et al. "Role of KATP channels in glucose-regulated glucagon secretion and impaired counterregulation in type 2 diabetes." *Cell metabolism* vol. 18,6 (2013): 871-82. doi:10.1016/j.cmet.2013.10.014
46. Cryer, Philip E. "Minireview: Glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes." *Endocrinology* vol. 153,3 (2012): 1039-48. doi:10.1210/en.2011-1499
47. MacDonald, Patrick E, and Patrik Rorsman. "Oscillations, intercellular coupling, and insulin secretion in pancreatic beta cells." *PLoS biology* vol. 4,2 (2006): e49. doi:10.1371/journal.pbio.0040049

48. Janah, Lina et al. "Glucagon Receptor Signaling and Glucagon Resistance." *International journal of molecular sciences* vol. 20,13 3314. 5 Jul. 2019, doi:10.3390/ijms20133314

49. Disponible en: <https://www.diabetesatlas.org/es/>

50. Laguesse E. Pancreas's structure and development from recent works. *J Anat Phys.* 1894; 30: 591–731

51. Finegood, D T et al. "Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model." *Diabetes* vol. 44,3 (1995): 249-56. doi:10.2337/diab.44.3.249

52. Kerr, J F et al. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *British journal of cancer* vol. 26,4 (1972): 239-57. doi:10.1038/bjc.1972.33

53. Fan, Ting-Jun et al. "Caspase family proteases and apoptosis." *Acta biochimica et biophysica Sinica* vol. 37,11 (2005): 719-27. doi:10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x

54. Montanya, E et al. "Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy." *Diabetes* vol. 49,8 (2000): 1341-6. doi:10.2337/diabetes.49.8.1341

55. Scaglia, L et al. "Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat." *Endocrinology* vol. 138,4 (1997): 1736-41. doi:10.1210/endo.138.4.5069



56. Scaglia, L et al. "Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas." *Endocrinology* vol. 136,12 (1995): 5461-8. doi:10.1210/endo.136.12.7588296
57. Smith, J C et al. "Hypertrophy and hyperplasia of the rat pancreas produced by short-term dietary administration of soya-derived protein and soybean trypsin inhibitor." *Journal of applied toxicology : JAT* vol. 9,3 (1989): 175-9. doi:10.1002/jat.2550090307
58. Bonner-Weir, Susan et al. "Islet neogenesis: a possible pathway for beta-cell replenishment." *The review of diabetic studies : RDS* vol. 9,4 (2012): 407-16. doi:10.1900/RDS.2012.9.407
59. Juhl, Kirstine et al. "Regenerating pancreatic beta-cells: plasticity of adult pancreatic cells and the feasibility of in-vivo neogenesis." *Current opinion in organ transplantation* vol. 15,1 (2010): 79-85. doi:10.1097/MOT.0b013e3283344932
60. Zhou, Qiao, and Douglas A Melton. "Pancreas regeneration." *Nature* vol. 557,7705 (2018): 351-358. doi:10.1038/s41586-018-0088-0
61. Srinivasan, Shanthi et al. "Enteric neuroblasts require the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/Forkhead pathway for GDNF-stimulated survival." *Molecular and cellular neurosciences* vol. 29,1 (2005): 107-19. doi:10.1016/j.mcn.2005.02.005
62. Lavery, William et al. "Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt nonautonomously promote perineurial glial growth in *Drosophila* peripheral nerves." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* vol. 27,2 (2007): 279-88. doi:10.1523/JNEUROSCI.3370-06.2007

63. Stefan, Y et al. "A quantitative immunofluorescent study of the endocrine cell populations in the developing human pancreas." *Diabetes* vol. 32,4 (1983): 293-301. doi:10.2337/diab.32.4.293

64. De Krijger, R R et al. "The midgestational human fetal pancreas contains cells coexpressing islet hormones." *Developmental biology* vol. 153,2 (1992): 368-75. doi:10.1016/0012-1606(92)90121-v

65. De Krijger, R R et al. "The midgestational human fetal pancreas contains cells coexpressing islet hormones." *Developmental biology* vol. 153,2 (1992): 368-75. doi:10.1016/0012-1606(92)90121-v

66. Malik, Sarah et al. "Recognition and management of hyperinsulinemic hypoglycemia after bariatric surgery." *Obesity research & clinical practice* vol. 10,1 (2016): 1-14. doi:10.1016/j.orcp.2015.07.003

67. Courtney, Monica et al. "The inactivation of Arx in pancreatic  $\alpha$ -cells triggers their neogenesis and conversion into functional  $\beta$ -like cells." *PLoS genetics* vol. 9,10 (2013): e1003934. doi:10.1371/journal.pgen.1003934

68. Habener, Joel F et al. "Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development." *Endocrinology* vol. 146,3 (2005): 1025-34. doi:10.1210/en.2004-1576

69. Rieck, Sebastian et al. "Lineage determinants in early endocrine development." *Seminars in cell & developmental biology* vol. 23,6 (2012): 673-84. doi:10.1016/j.semcd.2012.06.005

70. Jonsson, J et al. "Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice." *Nature* vol. 371,6498 (1994): 606-9. doi:10.1038/371606a0

71. Offield, M F et al. "PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum." *Development (Cambridge, England)* vol. 122,3 (1996): 983-95. doi:10.1242/dev.122.3.983
72. Gradwohl, G et al. "neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 97,4 (2000): 1607-11. doi:10.1073/pnas.97.4.1607
73. Sosa-Pineda, Beatriz. "The gene Pax4 is an essential regulator of pancreatic beta-cell development." *Molecules and cells* vol. 18,3 (2004): 289-94.
74. Collombat, Patrick et al. "Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development." *Genes & development* vol. 17,20 (2003): 2591-603. doi:10.1101/gad.269003
75. Collombat, Patrick et al. "The simultaneous loss of Arx and Pax4 genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the alpha- and beta-cell lineages in the mouse endocrine pancreas." *Development (Cambridge, England)* vol. 132,13 (2005): 2969-80. doi:10.1242/dev.01870
76. Collombat, Patrick et al. "Embryonic endocrine pancreas and mature beta cells acquire alpha and PP cell phenotypes upon Arx misexpression." *The Journal of clinical investigation* vol. 117,4 (2007): 961-70. doi:10.1172/JCI29115
77. Al-Hasani, Keith et al. "Adult duct-lining cells can reprogram into  $\beta$ -like cells able to counter repeated cycles of toxin-induced diabetes." *Developmental cell* vol. 26,1 (2013): 86-100. doi:10.1016/j.devcel.2013.05.018

78. Collombat, Patrick et al. "The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells." *Cell* vol. 138,3 (2009): 449-62. doi:10.1016/j.cell.2009.05.035
79. Herrera, P L. "Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages." *Development (Cambridge, England)* vol. 127,11 (2000): 2317-22. doi:10.1242/dev.127.11.2317
80. Thorel, Fabrizio et al. "Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss." *Nature* vol. 464,7292 (2010): 1149-54. doi:10.1038/nature08894
81. Dhawan, Sangeeta et al. "Pancreatic  $\beta$  cell identity is maintained by DNA methylation-mediated repression of Arx." *Developmental cell* vol. 20,4 (2011): 419-29. doi:10.1016/j.devcel.2011.03.012
82. Papizan, James B et al. "Nkx2.2 repressor complex regulates islet  $\beta$ -cell specification and prevents  $\beta$ -to- $\alpha$ -cell reprogramming." *Genes & development* vol. 25,21 (2011): 2291-305. doi:10.1101/gad.173039.111
83. Hillman, Ethan T et al. "Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract." *Microbes and environments* vol. 32,4 (2017): 300-313. doi:10.1264/jsme2.ME17017
84. de Faria Ghetti, Fabiana et al. "Influence of gut microbiota on the development and progression of nonalcoholic steatohepatitis." *European journal of nutrition* vol. 57,3 (2018): 861-876. doi:10.1007/s00394-017-1524-x
85. Spence, Jason R, and James M Wells. "Translational embryology: using embryonic principles to generate pancreatic endocrine cells from embryonic stem cells." *Developmental dynamics : an official publication of the American*

Association of Anatomists vol. 236,12 (2007): 3218-27.  
doi:10.1002/dvdy.21366

86. Cano, David A et al. "Pancreatic development and disease." *Gastroenterology* vol. 132,2 (2007): 745-62.  
doi:10.1053/j.gastro.2006.12.054

87. Murtaugh, L Charles. "Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible." *Development (Cambridge, England)* vol. 134,3 (2007): 427-38. doi:10.1242/dev.02770

88. Hammerman, Marc R. "Growing new endocrine pancreas in situ." *Clinical and experimental nephrology* vol. 10,1 (2006): 1-7. doi:10.1007/s10157-005-0393-4

89. Guthrie, Richard A, and Diana W Guthrie. "Pathophysiology of diabetes mellitus." *Critical care nursing quarterly* vol. 27,2 (2004): 113-25.  
doi:10.1097/00002727-200404000-00003

90. "Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus." *Diabetes care* vol. 20,7 (1997): 1183-97.  
doi:10.2337/diacare.20.7.1183

91. Genuth, Saul et al. "Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus." *Diabetes care* vol. 26,11 (2003): 3160-7.  
doi:10.2337/diacare.26.11.3160

92. American Diabetes Association. "Diagnosis and classification of diabetes mellitus." *Diabetes care* vol. 33 Suppl 1,Suppl 1 (2010): S62-9.  
doi:10.2337/dc10-S062

93. Harris, M I, and D C Robbins. "Prevalence of adult-onset IDDM in the U.S. population." *Diabetes care* vol. 17,11 (1994): 1337-40.  
doi:10.2337/diacare.17.11.1337
94. Naik, Ramachandra G et al. "Latent autoimmune diabetes in adults." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* vol. 94,12 (2009): 4635-44.  
doi:10.1210/jc.2009-1120
95. Maruyama, Taro et al. "Heterogeneity among patients with latent autoimmune diabetes in adults." *Diabetes/metabolism research and reviews* vol. 27,8 (2011): 971-4. doi:10.1002/dmrr.1238
96. Tattersall, R B, and S S Fajans. "A difference between the inheritance of classical juvenile-onset and maturity-onset type diabetes of young people." *Diabetes* vol. 24,1 (1975): 44-53. doi:10.2337/diab.24.1.44
97. Fajans, S S et al. "Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young." *The New England journal of medicine* vol. 345,13 (2001): 971-80. doi:10.1056/NEJMra002168
98. Naylor, Rochelle, and Louis H Philipson. "Who should have genetic testing for maturity-onset diabetes of the young?." *Clinical endocrinology* vol. 75,4 (2011): 422-6. doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04049.x
99. Stumvoll, Michael et al. "Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy." *Lancet (London, England)* vol. 365,9467 (2005): 1333-46.  
doi:10.1016/S0140-6736(05)61032-X
100. Domingues, Cleyton C et al. "Antioxidant-upregulated mesenchymal stem cells reduce inflammation and improve fatty liver disease in diet-induced obesity." *Stem cell research & therapy* vol. 10,1 280. 2 Sep. 2019,  
doi:10.1186/s13287-019-1393-8

101. Roshanzamir, Naeimeh, and Vahideh Hassan-Zadeh. "Methylation of Specific CpG Sites in IL-1 $\beta$  and IL1R1 Genes is Affected by Hyperglycaemia in Type 2 Diabetic Patients." *Immunological investigations* vol. 49,3 (2020): 287-298. doi:10.1080/08820139.2019.1656227
102. Genovese, S et al. "Clinical phenotype and beta-cell autoimmunity in Italian patients with adult-onset diabetes." *European journal of endocrinology* vol. 154,3 (2006): 441-7. doi:10.1530/eje.1.02115
103. Westermark, P et al. "Islet amyloid polypeptide--a novel controversy in diabetes research." *Diabetologia* vol. 35,4 (1992): 297-303. doi:10.1007/BF00401195
104. Gurlo, Tatyana et al. "Evidence for proteotoxicity in beta cells in type 2 diabetes: toxic islet amyloid polypeptide oligomers form intracellularly in the secretory pathway." *The American journal of pathology* vol. 176,2 (2010): 861-9. doi:10.2353/ajpath.2010.090532
105. Dunmore, Simon J, and James E P Brown. "The role of adipokines in  $\beta$ -cell failure of type 2 diabetes." *The Journal of endocrinology* vol. 216,1 T37-45. 2 Jan. 2013, doi:10.1530/JOE-12-0278
106. Fasshauer, Mathias, and Matthias Blüher. "Adipokines in health and disease." *Trends in pharmacological sciences* vol. 36,7 (2015): 461-70. doi:10.1016/j.tips.2015.04.014
107. Chung, Cheng-Ho et al. "Pancreatic  $\beta$ -cell neogenesis by direct conversion from mature  $\alpha$ -cells." *Stem cells (Dayton, Ohio)* vol. 28,9 (2010): 1630-8. doi:10.1002/stem.482
108. <http://farma.facmed.unam.mx/practicas/diabetes/>

109. Nauck, Michael A, and Juris J Meier. "The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions." *The lancet. Diabetes & endocrinology* vol. 4,6 (2016): 525-36. doi:10.1016/S2213-8587(15)00482-9
110. Maselli, Daniel B, and Michael Camilleri. "Effects of GLP-1 and Its Analogs on Gastric Physiology in Diabetes Mellitus and Obesity." *Advances in experimental medicine and biology* vol. 1307 (2021): 171-192. doi:10.1007/5584\_2020\_496
111. Lee, Young-Sun, and Hee-Sook Jun. "Anti-diabetic actions of glucagon-like peptide-1 on pancreatic beta-cells." *Metabolism: clinical and experimental* vol. 63,1 (2014): 9-19. doi:10.1016/j.metabol.2013.09.010
112. Nauck, M A et al. "Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans." *The American journal of physiology* vol. 273,5 (1997): E981-8. doi:10.1152/ajpendo.1997.273.5.E981
113. Koliaki, Chrysi, and John Doupis. "Incretin-based therapy: a powerful and promising weapon in the treatment of type 2 diabetes mellitus." *Diabetes therapy : research, treatment and education of diabetes and related disorders* vol. 2,2 (2011): 101-21. doi:10.1007/s13300-011-0002-3
114. Nauck, M A et al. "Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients." *Diabetologia* vol. 36,8 (1993): 741-4. doi:10.1007/BF00401145
115. Zhou, J et al. "Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic AR42J cells into glucagon- and insulin-producing cells." *Diabetes* vol. 48,12 (1999): 2358-66. doi:10.2337/diabetes.48.12.2358



116. Abraham, Elizabeth J et al. "Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells." *Endocrinology* vol. 143,8 (2002): 3152-61.  
doi:10.1210/endo.143.8.8973

117. Varndell, I M et al. "Localization of glucagon-like peptide (GLP) immunoreactants in human gut and pancreas using light and electron microscopic immunocytochemistry." *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* vol. 33,10 (1985): 1080-6. doi:10.1177/33.10.3900195

118. Eissele, R et al. "Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man." *European journal of clinical investigation* vol. 22,4 (1992): 283-91. doi:10.1111/j.1365-2362.1992.tb01464.x

119. Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, Holst JJ, Ebert R, Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993;91(1):301-7.

120. Buchwald, Henry. "The evolution of metabolic/bariatric surgery." *Obesity surgery* vol. 24,8 (2014): 1126-35. doi:10.1007/s11695-014-1354-3

121. Colquitt, Jill L et al. "Surgery for weight loss in adults." *The Cochrane database of systematic reviews* vol. 2014,8 CD003641. 8 Aug. 2014, doi:10.1002/14651858.CD003641.pub4

122. Melissas, John. "IFSO guidelines for safety, quality, and excellence in bariatric surgery." *Obesity surgery* vol. 18,5 (2008): 497-500.  
doi:10.1007/s11695-007-9375-9

123. Colquitt, Jill L et al. "Surgery for obesity." The Cochrane database of systematic reviews ,2 CD003641. 15 Apr. 2009, doi:10.1002/14651858.CD003641.pub3
124. Buchwald, Henry et al. "Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis." The American journal of medicine vol. 122,3 (2009): 248-256.e5. doi:10.1016/j.amjmed.2008.09.041
125. Camacho A. Modelos de cirugía bariátrica en rata Wistar normopesa y no diabética. Cambios histológicos a nivel pancreático y en la homeostasis de la glucosa. Cadiz University; 2015
126. Rubino, Francesco et al. "The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes." Annals of surgery vol. 244,5 (2006): 741-9. doi:10.1097/01.sla.0000224726.61448.1b
127. Salinari, Serenella et al. "Duodenal-jejunal bypass and jejunectomy improve insulin sensitivity in Goto-Kakizaki diabetic rats without changes in incretins or insulin secretion." Diabetes vol. 63,3 (2014): 1069-78. doi:10.2337/db13-0856
128. Rubino, Francesco et al. "The early effect of the Roux-en-Y gastric bypass on hormones involved in body weight regulation and glucose metabolism." Annals of surgery vol. 240,2 (2004): 236-42. doi:10.1097/01.sla.0000133117.12646.48
129. Rubino, Francesco. "Is type 2 diabetes an operable intestinal disease? A provocative yet reasonable hypothesis." Diabetes care vol. 31 Suppl 2 (2008): S290-6. doi:10.2337/dc08-s271

130. Mokadem, Mohamad et al. "Effects of Roux-en-Y gastric bypass on energy and glucose homeostasis are preserved in two mouse models of functional glucagon-like peptide-1 deficiency." *Molecular metabolism* vol. 3,2 191-201. 11 Dec. 2013, doi:10.1016/j.molmet.2013.11.010
131. Ley, Ruth E et al. "Obesity alters gut microbial ecology." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 102,31 (2005): 11070-5. doi:10.1073/pnas.0504978102
132. Orelle, B et al. "Human pancreatitis-associated protein. Messenger RNA cloning and expression in pancreatic diseases." *The Journal of clinical investigation* vol. 90,6 (1992): 2284-91. doi:10.1172/JCI116115
133. White, Peter et al. "Defining pancreatic endocrine precursors and their descendants." *Diabetes* vol. 57,3 (2008): 654-68. doi:10.2337/db07-1362
134. Winston, Jenessa A, and Casey M Theriot. "Diversification of host bile acids by members of the gut microbiota." *Gut microbes* vol. 11,2 (2020): 158-171. doi:10.1080/19490976.2019.1674124
135. Ridlon, Jason M, and Jasmohan S Bajaj. "The human gut sterolbiome: bile acid-microbiome endocrine aspects and therapeutics." *Acta pharmaceutica Sinica. B* vol. 5,2 (2015): 99-105. doi:10.1016/j.apsb.2015.01.006
136. Chen, Lei et al. "The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives." *Nature reviews. Endocrinology* vol. 8,4 228-36. 8 Nov. 2011, doi:10.1038/nrendo.2011.183
137. Halpern, Bruno, and Marcio C Mancini. "Type 2 diabetes and metabolic surgery guidelines and recommendations should urgently be unified." *Acta diabetologica* vol. 58,4 (2021): 531-536. doi:10.1007/s00592-020-01603-8

138. Wickremesekera, Kusal et al. "Loss of insulin resistance after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a time course study." *Obesity surgery* vol. 15,4 (2005): 474-81. doi:10.1381/0960892053723402

139. Schauer, Philip R et al. "Effect of laparoscopic Roux-en Y gastric bypass on type 2 diabetes mellitus." *Annals of surgery* vol. 238,4 (2003): 467-84; discussion 84-5. doi:10.1097/01.sla.0000089851.41115.1b

140. Clements, Ronald H et al. "Hormonal changes after Roux-en Y gastric bypass for morbid obesity and the control of type-II diabetes mellitus." *The American surgeon* vol. 70,1 (2004): 1-4; discussion 4-5.

141. Koopmans, H S et al. "The effects of ileal transposition on food intake and body weight loss in VMH-obese rats." *The American journal of clinical nutrition* vol. 35,2 (1982): 284-93. doi:10.1093/ajcn/35.2.284

142. Hickey, M S et al. "A new paradigm for type 2 diabetes mellitus: could it be a disease of the foregut?." *Annals of surgery* vol. 227,5 (1998): 637-43; discussion 643-4. doi:10.1097/00000658-199805000-00004

143. Rubino, Francesco, and Jacques Marescaux. "Effect of duodenal-jejunal exclusion in a non-obese animal model of type 2 diabetes: a new perspective for an old disease." *Annals of surgery* vol. 239,1 (2004): 1-11. doi:10.1097/01.sla.0000102989.54824.fc

144. Salas-Álvarez, Jesús M et al. "A novel surgical technique focused on the study of the ileum: The preduodenal ileal transposition." "Una nueva técnica quirúrgica focalizada en el estudio del íleon: la transposición preduodenal del íleon." *Cirugía y cirujanos* vol. 88,4 (2020): 402-409. doi:10.24875/CIRU.20001272

145. Oh, Tae Jung et al. "Contribution of the distal small intestine to metabolic improvement after bariatric/metabolic surgery: Lessons from ileal transposition surgery." *Journal of diabetes investigation* vol. 7 Suppl 1,Suppl 1 (2016): 94-101. doi:10.1111/jdi.12444

146. Mencarelli, Andrea et al. "Dissociation of intestinal and hepatic activities of FXR and LXRA supports metabolic effects of terminal ileum interposition in rodents." *Diabetes* vol. 62,10 (2013): 3384-93. doi:10.2337/db13-0299

147. Somogyi, E et al. "Ileal transposition: A non-restrictive bariatric surgical procedure that reduces body fat and increases ingestion-related energy expenditure." *Physiology & behavior* vol. 219 (2020): 112844. doi:10.1016/j.physbeh.2020.112844

148. Nausheen, S et al. "Effects of sleeve gastrectomy and ileal transposition, alone and in combination, on food intake, body weight, gut hormones, and glucose metabolism in rats." *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* vol. 305,4 (2013): E507-18. doi:10.1152/ajpendo.00130.2013

149. Strader, April D et al. "Ileal interposition improves glucose tolerance in low dose streptozotocin-treated diabetic and euglycemic rats." *Obesity surgery* vol. 19,1 (2009): 96-104. doi:10.1007/s11695-008-9754-x

150. Strader, April D et al. "Weight loss through ileal transposition is accompanied by increased ileal hormone secretion and synthesis in rats." *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* vol. 288,2 (2005): E447-53. doi:10.1152/ajpendo.00153.2004

151. Boozer, C N et al. "Ileal transposition surgery attenuates the increased efficiency of weight gain on a high-fat diet." *International journal of obesity* vol. 14,10 (1990): 869-78.

152. Ramzy, A R et al. "Ileal transposition surgery produces ileal length-dependent changes in food intake, body weight, gut hormones and glucose metabolism in rats." *International journal of obesity* (2005) vol. 38,3 (2014): 379-87. doi:10.1038/ijo.2013.201

153. Camacho-Ramírez, Alonso et al. "The histomorphometric parameters of endocrine pancreas after bariatric surgery in healthy animal models." *Tissue & cell* vol. 57 (2019): 78-83. doi:10.1016/j.tice.2019.02.008

154. Duan, Jinyuan et al. "Mid to distal small bowel resection with the preservation of the terminal ileum improves glucose homeostasis in diabetic rats by activating the hindgut-dependent mechanism." *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* vol. 18,6 (2014): 1186-93. doi:10.1007/s11605-014-2507-3

155. Yu, Hongwei et al. "Mechanism of Roux-en-Y gastric bypass treatment for type 2 diabetes in rats." *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* vol. 17,6 (2013): 1073-83. doi:10.1007/s11605-013-2188-3

156. Grueneberger, Jodok Matthias et al. "Long segment ileal transposition leads to early amelioration of glucose control in the diabetic obese Zucker rat." *Wideochirurgia i inne techniki maloinwazyjne = Videosurgery and other miniinvasive techniques* vol. 8,2 (2013): 130-8. doi:10.5114/wiitm.2011.32925

157. Oh, Tae Jung et al. "Ileal Transposition Decreases Plasma Lipopolysaccharide Levels in Association with Increased L Cell Secretion in Non-obese Non-diabetic Rats." *Obesity surgery* vol. 26,6 (2016): 1287-95. doi:10.1007/s11695-015-1879-0

158. Sørensen, L B et al. "No effect of physiological concentrations of glucagon-like peptide-2 on appetite and energy intake in normal weight

subjects.” *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* vol. 27,4 (2003): 450-6. doi:10.1038/sj.ijo.0802247

159. Meier, Juris J et al. “Glucagon-like peptide 2 stimulates glucagon secretion, enhances lipid absorption, and inhibits gastric acid secretion in humans.” *Gastroenterology* vol. 130,1 (2006): 44-54. doi:10.1053/j.gastro.2005.10.004

160. Cho, Young Min, and Timothy J Kieffer. “K-cells and glucose-dependent insulinotropic polypeptide in health and disease.” *Vitamins and hormones* vol. 84 (2010): 111-50. doi:10.1016/B978-0-12-381517-0.00004-7

161. Cho, Young Min et al. “Glucagon-like peptide-1: glucose homeostasis and beyond.” *Annual review of physiology* vol. 76 (2014): 535-59. doi:10.1146/annurev-physiol-021113-170315

162. Cani, P D et al. “Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability.” *Gut* vol. 58,8 (2009): 1091-103. doi:10.1136/gut.2008.165886

163. Zhu, Weiming et al. “Peptide YY induces intestinal proliferation in peptide YY knockout mice with total enteral nutrition after massive small bowel resection.” *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* vol. 48,5 (2009): 517-25. doi:10.1097/MPG.0b013e31818c5fd8

164. Guimarães, Marta et al. “Sleeve gastrectomy and gastric plication in the rat result in weight loss with different endocrine profiles.” *Obesity surgery* vol. 23,5 (2013): 710-7. doi:10.1007/s11695-013-0886-2

165. Portha, Bernard et al. "Activation of the GLP-1 receptor signalling pathway: a relevant strategy to repair a deficient beta-cell mass." *Experimental diabetes research* vol. 2011 (2011): 376509. doi:10.1155/2011/376509

166. Campos Martínez, FJ (2022). Transposición ileal preduodenal (pdit) en rata wistar. Implicaciones fisiopatológicas en el metabolismo hidrocarbonado en un modelo de roedor no diabético. [Tesis doctoral no publicada]. Universidad de Cádiz.

168. Courtney, Cathleen M et al. "Alterations in pancreatic islet cell function in response to small bowel resection." *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* vol. 319,1 (2020): G36-G42. doi:10.1152/ajpgi.00282.2019

169. Buteau, Jean et al. "Glucagon-like peptide 1 induces pancreatic beta-cell proliferation via transactivation of the epidermal growth factor receptor." *Diabetes* vol. 52,1 (2003): 124-32. doi:10.2337/diabetes.52.1.124

170. Drucker, Daniel J. "Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis." *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* vol. 17,2 (2003): 161-71. doi:10.1210/me.2002-0306

171. Buteau, J et al. "Protein kinase Czeta activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic beta-cell proliferation." *Diabetes* vol. 50,10 (2001): 2237-43. doi:10.2337/diabetes.50.10.2237

172. Li, Yazhou et al. "beta-Cell Pdx1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1." *Diabetes* vol. 54,2 (2005): 482-91. doi:10.2337/diabetes.54.2.482

173. Liu, Yuan et al. "Roux-en-Y gastric bypass-induced improvement of glucose tolerance and insulin resistance in type 2 diabetic rats are mediated by



glucagon-like peptide-1.” *Obesity surgery* vol. 21,9 (2011): 1424-31.  
doi:10.1007/s11695-011-0388-z

174. Bancalero-delosReyes, José et al. “Glucagon-Producing Cell Expansion in Wistar Rats. Changes to Islet Architecture After Sleeve Gastrectomy.” *Obesity surgery* vol. 31,5 (2021): 2241-2249.  
doi:10.1007/s11695-021-05264-6

175. Camacho-Ramírez, Alonso et al. “Bariatric surgery influences  $\beta$ -cell turnover in non obese rats.” *Histology and histopathology* vol. 32,12 (2017): 1341-1350. doi:10.14670/HH-11-909

176. Plachot, C et al. “Impaired beta-cell regeneration after partial pancreatectomy in the adult Goto-Kakizaki rat, a spontaneous model of type II diabetes.” *Histochemistry and cell biology* vol. 116,2 (2001): 131-9.  
doi:10.1007/s004180100302

177. Anlauf, Martin et al. “Persistent hyperinsulinemic hypoglycemia in 15 adults with diffuse nesidioblastosis: diagnostic criteria, incidence, and characterization of beta-cell changes.” *The American journal of surgical pathology* vol. 29,4 (2005): 524-33. doi:10.1097/01.pas.0000151617.14598.ae

178. Leenders, Floris et al. “Oxidative Stress Leads to  $\beta$ -Cell Dysfunction Through Loss of  $\beta$ -Cell Identity.” *Frontiers in immunology* vol. 12 690379. 4 Nov. 2021, doi:10.3389/fimmu.2021.690379

179. Bahrami, Jasmine et al. “Glucagon-like peptide-2 receptor modulates islet adaptation to metabolic stress in the ob/ob mouse.” *Gastroenterology* vol. 139,3 (2010): 857-68. doi:10.1053/j.gastro.2010.05.006

180. Doege, Holger et al. “Silencing of hepatic fatty acid transporter protein 5 in vivo reverses diet-induced non-alcoholic fatty liver disease and improves

hyperglycemia.” *The Journal of biological chemistry* vol. 283,32 (2008): 22186-92. doi:10.1074/jbc.M803510200

181. Lonardo, Amedeo et al. “A round trip from nonalcoholic fatty liver disease to diabetes: molecular targets to the rescue?.” *Acta diabetologica* vol. 56,4 (2019): 385-396. doi:10.1007/s00592-018-1266-0

182. Cernea, Simona, and Minodora Dobreanu. “Diabetes and beta cell function: from mechanisms to evaluation and clinical implications.” *Biochemia medica* vol. 23,3 (2013): 266-80. doi:10.11613/bm.2013.033

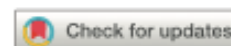
183. Brenner, Catherine et al. “Decoding cell death signals in liver inflammation.” *Journal of hepatology* vol. 59,3 (2013): 583-94. doi:10.1016/j.jhep.2013.03.033



**CAPITULO 8**  
**ACTIVIDAD CIENTÍFICA**



1. Salas-Álvarez JM, Campos-Martínez FJ, Moreno-Arciniegas A, Almorza-Gomar D, Pérez-Arana GM, Prada-Oliveira JA, Camacho-Ramírez A. A novel surgical technique focused on the study of the ileum: The preduodenal ileal transposition. Cir Cir. 2020;88(4):402-409. English. doi: 10.24875/CIRU.20001272. PMID: 32567585.



## A novel surgical technique focused on the study of the ileum: The preduodenal ileal transposition

*Una nueva técnica quirúrgica focalizada en el estudio del íleon: la transposición preduodenal del íleon*

Jesús M. Salas-Álvarez<sup>1</sup>, Francisco J. Campos-Martínez<sup>1</sup>, Alejandra Moreno-Arciniegas<sup>2</sup>, David Almorza-Gomar<sup>4,5</sup>, Gonzalo M. Pérez-Arana<sup>5</sup>, J. Arturo Prada-Oliveira<sup>3,5</sup>, and Alonso Camacho-Ramírez<sup>1,5,6\*</sup>

<sup>1</sup>Surgery Unit, Puerto Real University Hospital, Universidad de Cádiz; <sup>2</sup>Surgery Unit, Ceuta Hospital, Insalud; <sup>3</sup>Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, Universidad de Cádiz; <sup>4</sup>Department of Operative Statistics Universidad de Cádiz; <sup>5</sup>Instituto de Investigación e innovación biomédica de Cádiz (INIBICA); <sup>6</sup>Surgery Unit, Puerta del Mar University Hospital of Cádiz, Cadiz, Spain

### Abstract

**Aims:** Our main goal is to study the effects on the carbohydrate metabolism. Thus, we designed various experimental surgical models on healthy non-obese Wistar rats to reproduce several conditions. In this sense, we report a new experimental model. It is well known that bariatric surgery has important effects on the control of Type 2 Diabetes Mellitus. The underlying reasons are yet unknown, although the different theories focused in the release of different hormones after the pass of the nutrients through the tract. These released hormones have opposite effects that come together in a balanced glycemic metabolism.

**Materials and methods:** After bariatric surgical techniques, the modified anatomy resulted in an imbalance of the secreted hormones. Wistar rats were randomized in two groups Sham and surgical group. Our model consisted on the transposition of the terminal ileum right after the pylorus. Weight gain, food intake, and basal glycemia were measured weekly. **Results:** We did not obtain significant differences between both groups for these functional variables. **Conclusions:** This technique involved an early pass of the bolus through the ileum. The change on the luminal pH, along with the lack of enzymes to absorb the content, or the changes in the release of several hormones must be variables to the study. The mortality rate was assumable considering it was an experimental model on animals.

**Key words:** Diabetes. Malabsorption syndromes. Metabolic surgery. Incretines. Pancreas.

### Resumen

**Objetivo:** Crear un nuevo modelo quirúrgico experimental en ratas Wistar sanas no obesas para estudiar los efectos del metabolismo glucídico. Es bien sabido que las técnicas de cirugía bariátrica tienen un efecto importante sobre la resolución de la diabetes mellitus tipo 2. Se han invocado diferentes hipótesis, algunas centradas en el papel que tienen distintas hormonas secretadas por el propio tubo digestivo tras el paso de los nutrientes a su través, pero las razones últimas subyacentes permanecen desconocidas. El efecto contrapuesto de dichas hormonas consigue un efecto de control glucémico. El desequilibrio hormonal tras las alteraciones anatómicas de las cirugías bariátricas podría estar en la base de dicha mejora del me-

### Correspondence:

\*Alonso Camacho-Ramírez  
University of Cádiz  
Plaza Fragela, s/n  
C.P. 11003, Cádiz, Spain  
E-mail: acrcoril@yahoo.es  
0009-7411/© 2020 Academia Mexicana de Cirugía. Published by Permanyer. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Date of reception: 02-05-2019  
Date of acceptance: 28-03-2020  
DOI: 10.24875/CIRU.20001272

Cir Cir. 2020;88(4):402-409  
Contents available at PubMed  
[www.cirurgiaycirujanos.com](http://www.cirurgiaycirujanos.com)

*tabolismo glucídico final. Material y métodos:* Las ratas fueron operadas en dos grupos (control quirúrgico y experimental) y se procedió a disponerles el íleon anastomosado al antro pilórico, previo al esfínter pilórico. Medimos distintos parámetros funcionales (ganancia de peso, ingesta y glucemias semanales). **Resultados:** No obtuvimos diferencias significativas en la evolución de estos parámetros. **Conclusiones:** Este modelo será útil para nuestro propósito de estudiar el íleon, en su componente secretor de enterohormonas, cuando el paso de los nutrientes se produzca tempranamente. La mortalidad fue asumible, dada la innovación técnica realizada.

**Palabras clave:** Diabetes. Síndromes malabsortivos. Cirugía metabólica. Incretinas. Páncreas.

## Introduction

The different pathophysiological mechanisms that describe the behavior of metabolic surgery are not well-defined yet, but they are continuously being documented. There are two basic pillars that explain the functioning of this kind of surgery. First of all, the weight loss would reduce the insulin resistance of the peripheral tissue. Secondly, the gastrointestinal endocrine disruption, with hormones being synthesized in the digestive tract causing important changes of the behavior of glands – such as pancreas – and peripheral tissue<sup>1-3</sup>.

This second reason, at the same time, is based in two principal theories, the Foregut and the Hindgut theory. Both theories take into consideration the pass of the alimentary bolus through different sections of the digestive tube, which activates hormonal routes with favorable and unfavorable effects for the glycaemic homeostasis<sup>4</sup>. The main hormones involved are called incretines, a numerous group that includes glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP), glucagon-like peptide (GLP)-1, and ghrelin among other substances<sup>5,6</sup>.

The Hindgut theory is also known as the incretinic theory. It suggests that the early pass of the alimentary bolus as a result of a surgical procedure could explain the control of type 2 Diabetes Mellitus (T2DM). This early pass through the distal small bowel would stimulate the release of hormones such as GLP-1 or peptide tyrosine tyrosine<sup>7,8</sup>. That way, it would boost the insulin discharge, increasing its sensibility, and decreasing the beta cells apoptosis<sup>9</sup>.

In contrast, the anti-incretin effect is the cornerstone of the Foregut Theory. This opposite theory was based on the pass of nutrients through the proximal small bowel. The result is the release of different hormones. The anti-incretinic response buffers the previously cited incretinic effect. It produces a decrease in the discharge of insulin, decrease in the proliferation

of beta cells and inhibition of the action of insulin, to prevent hypoglycemia<sup>10-12</sup>.

While a balanced and coordinated production of incretin and anti-incretin hormones is necessary to keep normal levels of glucose, a poor anti-incretin production may not compensate the effect of the incretins, resulting in hyperinsulinemia, hypoglycemia, and beta cells proliferation<sup>13</sup>.

On the other hand, a change toward the excessive production of the anti-incretin hormones would cause an insulin resistance, decrease in the insulin secretion and the beta cell depletion; all of them features of the T2DM<sup>10</sup>.

The purpose of this report is the study of the specific role of the ileum. We designed a new experimental surgical model. The use of non-obese healthy Wistar rats was pursued to avoid other pathological or functional circumstances, such as obesity or diabetes. The model is not replicable in humans as a bariatric technique. This experimental model consists of a pre-duodenal ileal transposition (PDIT). The main goal is to place the ileal portion right after the pylorus. It is then anastomosed to the first portion of the duodenum, this way, the pyloric sphincter keeps its original anatomical disposition even though it is not functional anymore. Our goal is to determine the role of the terminal ileum, when located in an anomalous situation. The change of the anatomical configuration of the digestive tube has been investigated before by different investigation groups but our study provides a new technique, never published before, which brings the transposed ileum as proximal as possible in the digestive tube, right after the stomach to eliminate the foregut bias.

Hence, this way we open up a whole new range of possibilities to study related to the role held by the different portions of the digestive tract such as the terminal ileum, in the improvement of the glycaemic metabolism. In this paper, we report a new and feasible model which will lead to new pathways in the specific study of the ileal tract.



## Materials and methods

### Animals

Every procedure on animals was performed with the approval of the University of Cadiz Committee for the Ethical Use and Care of Experimental Animals. The rats were supplied from the University of Cadiz Animal Production Service, which included the specific laboratories to undergo surgeries. The 30 male Wistar rats were stabled in randomized groups with 15 rats each one of them – an experimental and a surgical control (Sham) group. The specimens were under constant temperature and humidity conditions in a 12-h light/dark cycle, with *ad libitum* access to normal chow and water. We did not use female rats to avoid the cyclic variations of gonadotropin hormonal effect on the glycemic metabolism. The rats were 12-14 weeks old and weighted around 300-350 g when surgery was undergoing. The survival period was 4 weeks after surgery.

### Weight gain and food intake basal glycemia

To evaluate the effect of the surgery in our model, we controlled the weight increase of the animals, as well as the grams of food the animals consumed. The chow intake and the weight increase were quantified every 5 days after surgery for the whole survival period.

Once a week, the basal glycaemia was measured with a glucometer (Glucocard G-Meter 1810, Menarini Diagnostics, Italy) and expressed as mg of glucose/deciliter of blood.

### Surgical techniques

The rats were randomly assigned to the experimental group – the PDIT – or to the control group (Sham). Both techniques were performed once the rats were anesthetized with gas (isoflurane). The anesthetic induction was achieved by impregnating a gauze with the same anesthetic after introducing the animal in a close container under an extractor hood to avoid the inhalation of gas by the surgeons. The anesthetic maintenance was obtained by the use of a continuous ventilation pump of isoflurane (between 1 and 3%, depending on the time needed for the procedure, and avoiding cardiorespiratory arrest). It was provided through a mask that included the rat's mouth and snout, and connected to the pump. A heat source underneath the animal was used in longer procedures

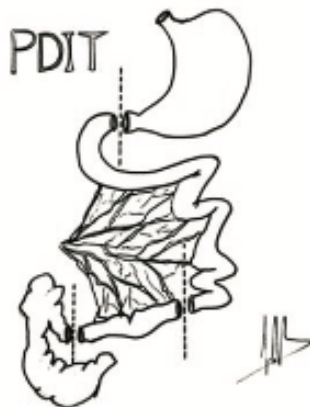


Figure 1. Firstly, ileum was identified and transected at 10 cm of ileum-cecal valve.

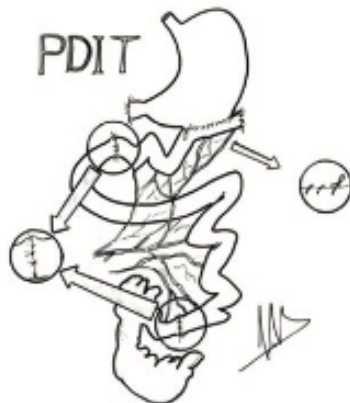
to avoid hypothermia due to the abdominal cavity exposure. In the end, we tried to reproduce the external conditions similar to the ones in regular surgery and thus, reduce the mortality rate and biases that could interfere in the normal interpretation of the data.

In the PDIT group, the surgical procedure was as followed. The incision made was bisubcostal after cleansing the abdominal wall with chlorhexidine. Then, the whole small bowel was exposed as well as the cecum. Afterward, the stomach was mobilized for a better exposure after liberating the lesser omentum. We measured the past 10 cm of the terminal ileum and divided it (Fig. 1), preserving the vascular supply and the distal edge 1 cm away from the ileocecal valve (Fig. 2). To reduce the mortality in the early samples, the method was modified to reduce the aggression on the ileal vessels. Then, a transverse post-pyloric division was made, closing the duodenal stump with a running suture with polydioxanone (PDS) 5/0. The distal duodenal stump was anastomosed to the distal edge of the transposed ileum with interrupted stitches of PDS 5/0 while the proximal edge of the ileum was anastomosed to the posterior gastric face with continuous suturing with PDS 5/0 after opening the greater omentum (Fig. 3).

Finally, the last anastomosis made was between the jejunum and terminal ileum, made with interrupted sutures of PDS 5/0. Before closing the abdominal wall, an anesthetic infiltration was performed with 2% mepivacaine diluted in physiological saline solution (1:10). Before closing the abdominal wall with a running suture with Vicryl 2/0, the whole intestinal mass was introduced inside the cavity with warm physiological



**Figure 2.** This section of ileum and the vessels were located proximally. Duodenum was cutted after pylorum.



**Figure 3.** Finally, termino-terminal or termino-lateral sutures were made to stablish the new nutritional flow.

saline solution (36°C). This surgical technique was always performed by the same main surgeon.

The control group technique (Sham) reproduced the surgical aggression over the digestive tract and the stress of the animal, before and after the surgical procedure but maintained the anatomical disposition of the digestive tube. It was performed by a bisubcostal incision after cleansing the abdominal wall with chlorhexidine allowing the exposure of the small bowel loops. Then, we measured the distance from the angle of Treitz to the ileocecal valve. A transversal enterotomy section was performed at 10 cm of the Treitz angle, without intestinal resection. Then, we made an end-to-end anastomosis with interrupted sutures of PDS 5/0.

The rats from both surgical groups were closely monitored for 2 h after the surgical procedure was

completed. Post-operative analgesia was performed by the use of a mixture of 13 ml of ibuprofen (Dalsy) in 500 ml of water. A hyperproteic liquid diet was included 12 h after the surgeries. The diet based on Resource® Protein diluted in water (1:4) was used for 48 h before the introduction of solid standard chow (250g).

### **Statistical analysis**

The measured data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Comparisons between both groups were performed using the ANOVA test. Once the non-parametric samples character was established, these data were analyzed with a Mann-Whitney U-test and  $p < 0.05$  was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS statistical software, version 24.0.

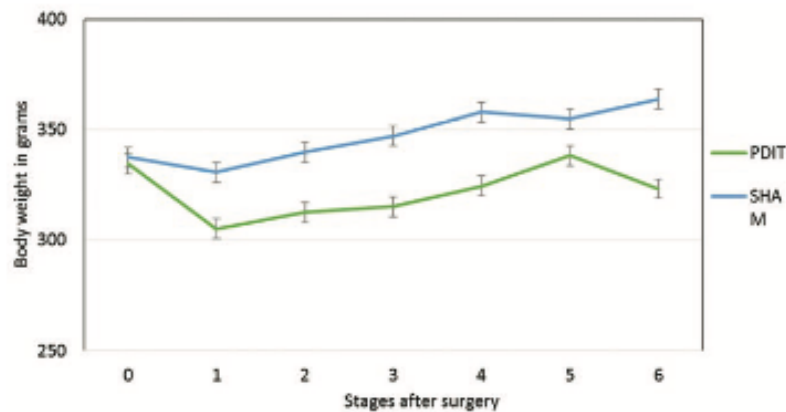
### **Results**

In this section, the described results report the functional variables measured during the survival period. During this stage, these parameters showed us the adaptive processes to keep a balanced homeostatic glycaemia. Thus, the results of the variables detailed some indirect measurable aspect of the nutrient absorption and posterior pancreatic processing.

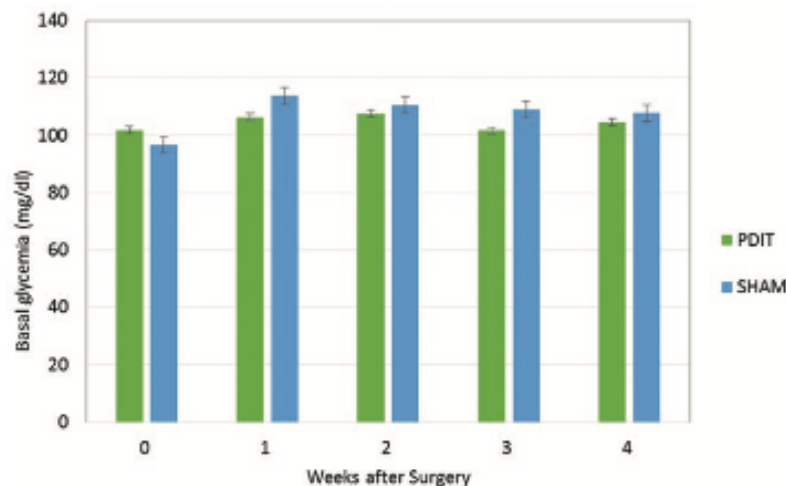
### **Weight gain and chow intake, basal glycemia**

The weight evolution, food intake, and basal glycaemia were monitored from post-operative day 1 until the sacrifice, 1 a week. The mean weight per week for each group was expressed in grams. The body weight decreased after procedures in both groups. However, there were no significant differences between any of them at any point (Fig. 4). In both groups, the body weight decreased within the 1<sup>st</sup> week after surgery and then recovered. In the Sham group, body weight increased slowly and progressively until the end of the study, while the PDIT group presented a weight loss at the 4<sup>th</sup> week, without recovering the initial weight.

Similarly, the food intake did not show any difference between both groups. The food consumption was reduced in all the employed animals in this study compared to the normal intake measured in the animal laboratory (Science Education Partnership Award).



**Figure 4.** Weight gaining (grams) represented on the Y-axis the experimental (pre-duodenal ileal transposition (PDIT)) and control (SHAM) groups. Time was represented in the X-axis in, 5-days periods. No significant differences were found between PDIT and SHAM group during this period. The surgical PDIT group showed a slight weight loss due to the surgical aggression, but the differences were not significant.



**Figure 5.** Basal Glycemia after the fasting period was represented in the Y-axis as glucose mg/dl (mean  $\pm$  standard error of the mean) in both experimental (pre-duodenal ileal transposition) and SHAM groups along time, represented in weeks in the X-axis. Blood glucose levels did not show significant difference between both groups.

As well as the average basal glycemia per week, which was expressed in mg/dl, and showed no significant changes were observed in the basal glycemia during the period of the study (Fig. 5). We analyzed the summative interpretation of glycemic – area under the curve – and again, no differences were found.

### Surgical procedures

Throughout the observation period, six rats out of the 30 rats that we had in the beginning of the study died,

which made a 20% of the total mortality rate. In the surgical group, four out of the 15 rats died, which constituted a death rate of 26.6%, while in the Sham group, the mortality rate was the 13% (two out of the 15 rats).

None of the deaths happened, while the surgical procedure was taking place. All deaths occurred after post-operative day 1. All deceased rats died between 24 and 96 h after the surgical intervention. After this, animals were sacrificed after 4 weeks after surgeries. Although the expected weight gown for malnutrition, we did not find any other valuable data.

## Discussion

Each day increases the knowledge of bariatric metabolic surgery. This is supported by the daily outbreak of new hypotheses. However, the results of scientific investigations are not conclusive on the mechanism of action of metabolic surgery. In this sense, the ileum is a part of the intestine yet to be studied. Its contributions are very important, but there are many questions to clarify. The previous studies carried out to date are based on an ileal location at the post-duodenal and pre-jejunal level<sup>13-16</sup>. In addition, generally such ileal interposition was usually associated with another bariatric surgery technique. This article discusses the viability of the transposition of the ileum in a place not described yet (a pre-duodenal localization), without an associated bariatric component. The aim of the study was to know the viability of the model. For this reason, we worked with healthy non-obese rats unlike most of the bibliographic references that are based on studies with diabetic and/or obese animals. Our interest is related to the specific implications of ileum in the resolution of T2DM. Thus, once the model could be well-established, we can follow the cellular participation of ileum at the hormonal level.

The number of complications and mortality was reasonable, although higher than the average mortality obtained in similar previous studies. The overall mortality rate of our study was the 20%, with a mortality lower than the 26% in the surgical group. In addition, none of the deaths occurred during the surgical intervention, always occurred between the first 24 and 96 h postoperatively. Anastomotic leaks and subsequent intraperitoneal infection could be probably the main causes of this mortality rate due to the reintroduction of solid diet and the non-use of antibiotic prophylaxis. Meanwhile, no unusual findings were found during the sacrifice phase. Apart the common peritoneal adhesions, no bowel dilatations or obstruction were observed.

We cannot ignore the possibility of severe metabolic failure due to intense hyperglycemia in the animals, but ketoacidotic symptoms were not observed. Thrombotic or vascular complications, due to the traction over the ileal vessels, might not be excluded. Although we did changes on the initial surgical procedures about the route of ileal vessels. This technical modifications would have helped minimize the mentioned problems. The techniques performed so far in the metabolic surgery field were developed from the bariatric

surgery, so weight loss was unavoidable. In our case, we did not find a significant weight loss after the surgery. This supported the results of the previous studies. New studies in a model of diabetic non-obese rats could be done to corroborate these results. The glycemic measurements showed no differences compared to the control group. However, we expected these differences; the rats of the PDIT group could stand a slight lower glycemia, due to a possible improvement in glucose tolerance at the expense of an increase in insulin sensitivity<sup>15,16</sup>. On the other hand, posterior studies could determine changes in pancreas cellularity that could explain glycemic behavior. This is one of our next analysis of the extracted pancreas.

Regarding the hormonal effect, the Hindgut Theory as well as the Foregut Theory has in common the importance of the role of the digestive tract. Therefore, they are not mutually exclusive. The interposition of the ileum in a post-gastric and pre-duodenal location determined an alteration of the intestinal flow. This conditioned a modification of the incretines and anti-incretines signals. In this respect, it would be interesting to investigate the modifications in the enterohormonal levels (e.g., GLP-1, GIP, PPY, as well as the specific receptors) after this surgical model<sup>16,17</sup>. The different portions of small bowel will be analyzed to determine the changes in releasing cellularity. Mainly, the GLP-1 releasing L-cells located in the ileum, which has been located in extended location after RYGB<sup>18</sup>.

Bariatric surgeries, depending on the kind of procedure, had an effect on the concentration of the circulating biliary salts. The terminal ileum, when it was located in an anomalous situation, could determine a change on the circulating levels of the biliary salts. In the ileal lumen, gastric content will be secreted without bile salts and pancreatic enzymes. In addition, the pH will be very acid, straight from the stomach, not buffered yet. This was contributed by a different duodenal situation, distal to the ileum. The lack of enzymes stopped the content and micronutrients from being absorbed. This change could improve the glycemic homeostasis in the diabetic patient<sup>19,20</sup>.

The modification of the anatomy changed the quality and quantity of absorbed nutrients. The changes must induce in the composition, characteristics, and activity of the intestinal microbiota, which could explain the partial improvement of hydrocarbon metabolism after bariatric surgery. The relationship

between the different incretins and the changes in the concentrations of the circulating biliary salts might be important and should be the subject of future studies. Moreover, the nervous system is a whole field to explore, since we preserved the vascularization and the enteric nerves. Therefore, the potential alterations that this technique produced in the normal development of nutrition and metabolism must be considered.

We can conclude that the reported technique is both, new and reasonable, with a relatively assumable mortality rate in an experimental model. More studies are needed in this direction, which could value different animal models and objectivize the real hormonal changes. Our study could open a new range of possibilities in the field of the metabolic surgery, since the improvement of the carbohydrate metabolism in patients after this kind of procedures is still a conundrum. The histological analyses are currently being developed. Several studies are in progress: focusing the histology of the pancreas, considering the changes in cellularity of  $\beta$ -cell mass, and the expansions in releasing cellularity of the different portions of intestine. Both kind of studies have been developed in other previous papers<sup>6,9,18</sup>.

The objective was to obtain an experimental model. The extrapolation of the obtained results to humans is possible. We defend the rational use of this animal model. In this methodological sense, a higher statistical power could have provided stronger and more significant results. Although the objective of the study was well defined, the validity of the surgical model will be better through another series of functional and histological determinations.

## Acknowledgements

The authors desire to thank the technical assistance and figures drawing of Mr. Juan Jesus Gallardo Pacheco.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest. All the authors declare to know and to sign the disclosure and conflict statement. We did not receive payment or services from a third party (government, commercial, private foundation, etc.) for any aspect of the submitted work. We have not financial relationships with entities which could be related to the aim of the study. We have no any patents or manuscript, pending or issued,

broadly relevant to this work. There are no other relationships or activities that readers could perceive to have influenced, or that give the appearance of, or potentially influencing, what we have written in the submitted work.

## Funding

This work was partially supported for the Asociación Gaditana de Apoyo al Investigador (AGAI).

## Ethical disclosures

**Protection of human and animal subjects.** The authors declare that the procedures followed were in accordance with the regulations of the relevant clinical research ethics committee and with those of the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

**Confidentiality of data.** The authors declare that no patient data appear in this article.

**Right to privacy and informed consent.** The authors declare that no patient data appear in this article.

## References

- Näslund E, Kral JG. Impact of gastric bypass surgery on gut hormones and glucose homeostasis in Type 2 diabetes. *Diabetes*. 2006;55: S92-7.
- Rubino F, Panagiotopoulos S. Surgery: metabolic surgery: the cutting edge of diabetes care. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14: 389-90.
- Rubino F, Gagner M, Gentileschi P, Kini S, Fukuyama S, Feng J, et al. The early effect of the roux-en-y gastric bypass on hormones involved in body weight regulation and glucose metabolism. *Ann Surg*. 2004;240:236-42.
- Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ, et al. Weight and Type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med*. 2009;122:248-56.
- Dimitriadis G, Manolagas S, Randeava A, Miras D. Potential hormone mechanisms of bariatric surgery. *Curr Obes Rep*. 2017;6:253-65.
- Meek CL, Lewis HB, Reimann F, Gribble FM, Park AJ. The effect of bariatric surgery on gastrointestinal and pancreatic peptide hormones. *Peptides*. 2016;77:28-37.
- Cummings DE, Overduin J, Foster-Schubert KE. Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolution. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2608-15.
- Mason EE. The mechanisms of surgical treatment of Type 2 diabetes. *Obes Surg*. 2005;15:459-61.
- Camacho A. Modelos de Cirugía Bariátrica en Rata Wistar Normopesa y no Diabética, Cambios Histológicos a Nivel Pancreático y en la Homeostasis de la Glucosa. Thesis. Spain: University of Cadiz; 2015.
- Rubino F, Marescaux J. Effect of duodenal-jejunal exclusion in a non-obese animal model of Type 2 diabetes: a new perspective for an old disease. *Ann Surg*. 2004;239:1-11.
- Rubino F, Forgione A, Cummings DE, Vix M, Gruli D, Mingrone G, et al. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Ann Surg*. 2006;244:741-9.
- Salmari S, Le Roux CW, Bertuzzi A, Rubino F, Mingrone G. Duodenal-jejunal bypass and jejunectomy improve insulin sensitivity in goto-kakizaki diabetic rats without changes in incretins or insulin secretion. *Diabetes*. 2014;63:1069-78.
- Culnan DM, Albaugh V, Sun M, Lynch CJ, Lang CH, Cooney RN. Ileal interposition improves glucose tolerance and insulin sensitivity in the obese Zucker rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010; 299:G751-60.

14. Cummings BP, Strader AD, Stanhope KL, Graham JL, Lee J, Raybould HE, et al. Ileal interposition surgery improves glucose and lipid metabolism and delays diabetes onset in the UCD-T2DM rat. *Gastroenterology*. 2010;138:2437-46.
15. Duan J, Zhou J, Ren F, Tan C, Wang S, Yuan L. Mid to distal small bowel resection with the preservation of the terminal ileum improves glucose homeostasis in diabetic rats by activating the hindgut-dependent mechanism. *J Gastrointest Surg*. 2014;18:1186-93.
16. Sun X, Zheng M, Song M, Bai R, Cheng S, Xing Y, et al. Ileal interposition reduces blood glucose levels and decreases insulin resistance in a Type 2 diabetes mellitus animal model by up-regulating glucagon-like peptide-1 and its receptor. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7:4136-42.
17. Buchwald H, Dorman RB, Rasmus NF, Michalek VN, Landvik NM, Ikramuddin S. Effects on GLP-1, PYY, and leptin by direct stimulation of terminal ileum and cecum in humans: implications for ileal transposition. *Surg Obes Relat Dis*. 2014;7:4136-42.
18. Moreno A, Falckenheimer J, Bancalero J, Camacho A, Prada JA, Pérez G. The main participation of the enterohormone GLP-1 after bariatric surgery. *Minerva Chir*. 2018;74:7-13.
19. Fiorucci S, Distrutti E. Bile acid-activated receptors, intestinal microbiota, and the treatment of metabolic disorders. *Trends Mol Med*. 2015;21:702-14.
20. Kaska L, Siedziński T, Chomiczewska A, Dettlaff-Pokora A, Swierczyński J. Improved glucose metabolism following bariatric surgery is associated with increased circulating bile acid concentrations and remodeling of the gut microbiome. *World J Gastroenterol*. 2016;22:8698-719.



- 2. Prada-Oliveira JA, Camacho-Ramirez A, Salas-Alvarez J, Campos-Martinez FJ, Lechuga-Sancho AM, Almorza-Gomar D, Blandino-Rosano M, Perez-Arana GM. GLP-1 mediated improvement of the glucose tolerance in the T2DM GK rat model after massive jejunal resection. Ann Anat. 2019 May;223:1-7. doi: 10.1016/j.aanat.2019.01.007. Epub 2019 Feb 2. PMID: 30721719.**





## RESEARCH ARTICLE

# GLP-1 mediated improvement of the glucose tolerance in the T2DM GK rat model after massive jejunal resection

J. Arturo Prada-Oliveira<sup>d,\*</sup>, Alonso Camacho-Ramirez<sup>a</sup>, Jesús Salas-Alvarez<sup>a</sup>, Francisco Javier Campos-Martinez<sup>a</sup>, Alfonso M. Lechuga-Sancho<sup>b</sup>, David Almorza-Gomar<sup>e</sup>, Manuel Blandino-Rosano<sup>c</sup>, Gonzalo M. Perez-Arana<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Surgery Unit, Puerto Real Hospital, University of Cádiz, Spain

<sup>b</sup> Department of Pediatric and Maternal Health and Radiology, Pediatric Endocrinology, Puerta del Mar Hospital, University of Cádiz, Spain

<sup>c</sup> Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolism Division, Miller School of Medicine, University of Miami, United States

<sup>d</sup> Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, University of Cádiz

<sup>e</sup> Department of Operative Statistic and Research, University of Cádiz, Spain



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 6 July 2018

Received in revised form 4 January 2019

Accepted 23 January 2019

## Keywords:

GLP-1

Enterohormones

type 2 Diabetes mellitus

Malabsorption Syndromes

Insulin-Secreting Cells

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to clarify the role of the middle gut in the entero-pancreatic axis modification that leads to glucose improvement in the Goto-Kakizaki (GK) rat as a non-obese T2DM model.

**Background:** Bariatric surgery is considered an assured solution for type 2 Diabetes (T2DM). Enterohormones such as ghrelin, gastric inhibitory polypeptide and mainly glucagon-like peptide-1 (GLP-1) were recognized as key players in the physiopathological mechanisms associated with entero-pancreatic axis regulation and glucose tolerance improvement. However, the influence of anatomical arrangements post-bariatric surgery on this axis is still debatable.

**Method:** To this purpose, 50% of small intestine resections were performed on GK rats (n = 6), preserving the proximal half of the jejunum and the ileum (IR50). Phenotypic and functional changes, such as performance in oral glucose tolerance tests, ileal release of GLP-1, beta-cell sensitivity to GLP-1, beta-cell mass, and turnover were characterized in IR50 and the surgical control group (Sham).

**Results:** The glucose tolerance was improved and ileal release of GLP-1 was enhanced four weeks after IR50 versus the control group rats. Beta-cell mass, beta-cell proliferation, and beta-cell sensitivity to GLP-1 were also increased in the pancreas of IR50 versus the control group rats.

**Conclusion:** the jejunal exclusion increases beta-cell-mass and improves glucose tolerance by increasing in GLP-1 expression and number of receptors via the entero-pancreatic axis.

© 2019 Elsevier GmbH. All rights reserved.

## 1. Introduction

Obesity is a major public health problem in Western societies due to treatment costs, long-term effects on health, and high prevalence. An important obesity-associated pathology is Type 2 Diabetes (T2DM), characterized by a beta-cell failure along with peripheral and hepatic insulin resistance. The prevalence of T2DM has been estimated to affect 5–10% of the population, although trending upwards globally, especially in young people (Wild et al. 2004).

Since the 1990s many authors have reported the effects of bariatric surgery on glucose control in T2DM subjects, with 70 to 90% of patients remaining euglycemic without pharmacological treatment for several years after the procedure (Porjes et al., 1995; Smith et al. 1996). Many authors have suggested a relationship between digestive tract modification and glucose homeostasis as one of the main mechanisms implied in this euglycemic status (Alejandro et al. 2015). Many hypotheses were presented to explain these effects.

Some hypotheses focused on the gastrointestinal (GI) hormone suggesting that the functions of one or more GI hormones (e.g. GLP-1, GIP, PYY, Ghrelin, etc.) could be fundamental factors. Surgical techniques have altered the normal disposition of the intestinal tube. As a result of these surgeries, the normal flow and absorption of nutrients were altered in the different portion of intestine (Baggio & Drucker, 2007; Cummings and Shannon 2003). These

\* Corresponding authors at: Department of Human Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine, Plaza Fragela s/n, University of Cádiz, Cádiz, 11003, Spain.  
E-mail address: [arturo.prada@uca.es](mailto:arturo.prada@uca.es) (J.A. Prada-Oliveira).

<sup>†</sup> Both authors are equally co-responsible of the corresponding authority.

changes in the intestinal mucosae would change the secretion pattern of the hormones (Batterham, 2016; Rubino 2008; Yousseif et al. 2014).

Other hypotheses focused on the potential role of biliary acids (BA) in regulating hepatic glucose (Penney et al. 2015), or on the existence of a control for a brain-gut-nervous system axis. In this axis, some gut-derived enterohormones could act as regulators of the central nervous system through a feedback mechanism of hepatic glucose production (Wang et al. 2008; Breen et al. 2012).

Nevertheless, the secretion of GI hormones, such as GIP, Ghrelin, or GLP-1, seems to be involved directly or indirectly in the anti-diabetic effects of bariatric surgery. Focusing on GLP-1, it is known that this hormone has the capacity to induce  $\beta$ -cell proliferation in rodents (Drucker, 2003) and improves hepatic insulin sensitivity in mice after bariatric/metabolic surgery (Garibay et al. 2016). Although, these results have not always been reproduced employing Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB) or Sleeve gastrectomy (SG) techniques (Mokadem et al. 2013; Chambers et al. 2014). It is therefore difficult to discern which part of glucose tolerance improvement is due to enhanced GLP-1 secretion and which one is not, especially because these surgeries affect different anatomical elements.

In the present study we used a surgical experimental technique on a non-obese diabetic animal model as the Goto-Kakizaki rat (GK), which exclusively affects the gut but not the stomach. We conducted a resection of 50% of the small intestine with the aim to determine the role of GLP-1 in improving glucose tolerance. We then analyzed the effect of such resection on GLP-1 secretion in ileum, GLP-1 pancreatic  $\beta$ -cell sensitivity, and  $\beta$ -cell population turnover. Thus, our purpose was to confirm the relationship between the changes in the intestinal GLP-1 release and pancreatic sensitivity, as a possible consequence of the entero-pancreatic axis.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals

All animal procedures were performed with the approval of the University of Cadiz Committee for the Ethical Use and Care of Experimental Animals. This Committee controlled the procedures were performed in accordance with international relevant guidelines and regulations for animal welfare. The animals proceeded by the Animal Service and Production Unit (SEPA, at the University of Cádiz). The twelve male Goto-Kakizaki (GK) rats were randomly distributed to sham and IR50 surgical groups ( $n = 6$ ). Animals were kept under constant temperature and humidity conditions in a 12-hour light/dark cycle, with ad libitum access to regular chow and water. GK rats weighed 220 g to 250 g when the surgical protocol was performed. Female rats were not used to avoid the cyclic variations of gonadotropins and its effect on the glycaemic metabolism.

### 2.2. Weight Gain and Food Intake - Basal Glycaemia

To evaluate the effect of the surgery on animals, we monitored several variables. The weight gain and food ingested were quantified daily after surgery and every 48 h from the second week until sacrifice. Once a day, after surgery until sacrifice, basal glycaemia was measured with a glucometer (Glucocard G-Meter 1810, Menarini diagnostics, Italy) and expressed in milligrams of glucose/deciliter of blood.

### 2.3. Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

A blood sample of 0.5 ml was collected from the tail vein of each animal after an overnight 12 hour fast to obtain basal glycaemia. Through an orogastric tube, a 40% glucose solution (2 gr/Kg body

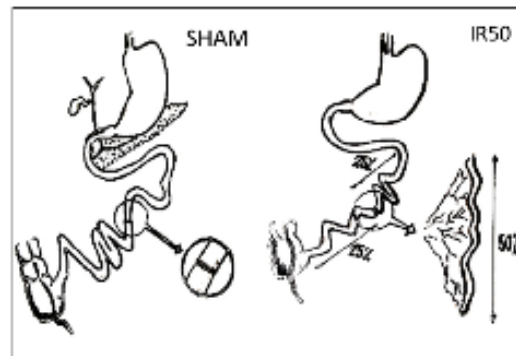


Image 1. XXX.

weight) was administered. The glycaemia was monitored by blood sampling from the tail vein at 15, 30, 60 and 120 minutes after glucose administration. We realized the OGTT four weeks after the surgical procedure.

### 2.4. Surgical Interventions and Fasting Periods

Both experimental groups underwent identical preoperative and postoperative conditions, with a 12 h fast pre and post-surgical procedure. All surgical procedures were performed under anesthesia by continuous infusion of Isoflurane 3% V/V (Isoflo, Abbott 571329.8). Finally, they went through a re-adaptation period after surgery to normalize fasting.

The surgical IR50 group ( $n = 6$ ) was performed in the following steps. Firstly, a 3 cm laparotomy was performed in the midline of the abdomen, and through the incision we identified Treitz's angle and the ileocecal valve as anatomical references. The bowel between these points was exposed and measured. We made a resection of the central 50%, followed by an end-to-end anastomosis with 4-0 monoplane suture (polypropylene, Ethicon Prolene), leaving the proximal half of the jejunum and most of the ileum (Image 1). Finally, the abdominal wall was closed in one layer. The control group ( $n = 6$ ) followed the sham procedure. After measuring the gut, a transversal enterotomy section followed by an end-to-end anastomosis without intestinal resection was done.

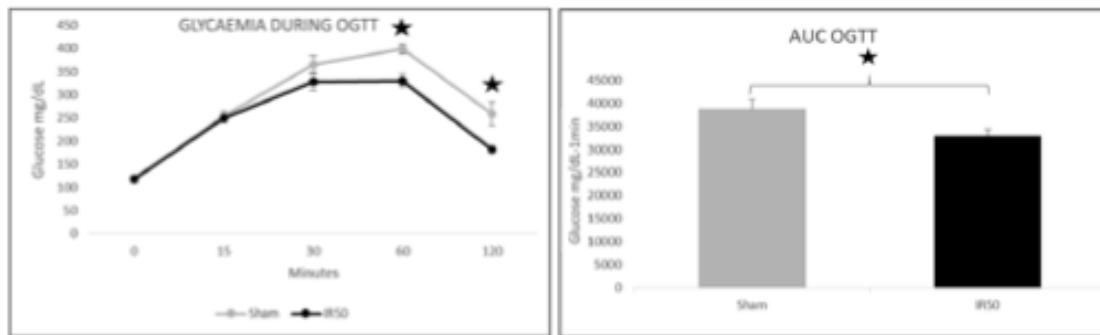
### 2.5. Tissue Preparation

Five weeks after the surgical intervention, animals were sacrificed by an Isoflurane inhalation overdose. Pancreas and gut portions were perfused with Bouin's solution. After this, the pancreas and ileum were resected, weighed (precision scale Ohaus Pioneer Mod PA 3102), and post-fixed in Bouin's solution for 24 h at 4°C. The fixed pieces were dehydrated, paraffin embedded, and 10  $\mu$ m microtome sections were obtained.

### 2.6. Beta-cell Mass Quantification

To calculate  $\beta$ -cell mass, insulin producing cells were stained using a monoclonal mouse anti-insulin antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and a secondary peroxidase conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and then revealed with solution of 0.3 mg/ml of 3,3'-Diaminobenzidine.

The insulin-positive areas were measured by using Image J image analysis software. Those who performed the measurements in all immunohistochemical techniques were not aware of which experimental group the samples belonged to. Beta-cell mass was measured Insulin + area/total pancreatic area ratio by the total pan-



**Fig. 1.** A. Oral glucose tolerance test (OGTT). Glycaemia was represented in the Y-axis as glucose mg/dl (mean±SEM) in both experimental groups along time, represented in minutes in the X-axis. \* $P \leq 0.05$ . B. The area under curve (AUC) of the graph showed statistical differences in glucose tolerance between groups. Blood glucose levels showed significant differences between Sham and IR50 at minute 60 and 120 of the OGTT.

creas weight, expressed in mg. Islet and insulin positive areas were quantified at 20 islets/per sample in two sample/per pancreas separated for 100  $\mu\text{m}$ .

### 2.7. Apoptosis Assays

To determine  $\beta$ -cell apoptosis, 10  $\mu\text{m}$  tissue sections from each pancreas were mounted on microscope slides and rehydrated with graded ethanol to PBS. The Dead End Fluorometric Terminal Deoxynucleotidyl-Transferase-mediated 2'-deoxyuridine 5'-Triphosphate nick end Labelling (TUNEL) system (Promega, Madison, WI, USA) was used to identify apoptotic cells, and the procedure was performed following the manufacturer's instructions. Insulin was simultaneously counterstained using polyclonal mouse anti-insulin antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) incubated overnight at 4  $^{\circ}\text{C}$ , and then stained with a secondary anti-mouse IgG conjugated antibody (Alexa 546) (Molecular Probes Inc. Eugene, USA). To determine the apoptotic fraction, TUNEL+/Insulin+ cells and islet areas were quantified in 20 islets/per sample, in two samples/per pancreas (TUNEL+/insulin+ cells/ $\text{mm}^2$  of islet). We used the image analysis Cell D software (Olympus, Hamburg, Germany). Negative samples were carried out as controls to ensure the immunohistochemical techniques. Positive controls were carried out in neural tissue samples of hypoxic rat.

### 2.8. Proliferation Assays

Proliferation was assessed by double immunostaining, using polyclonal rabbit anti-Ki67 (Abcam, Cambridge, CB4 OFL UK) and monoclonal mouse anti-insulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) antibodies. Sections were stained using anti-rabbit IgG Alexa 488 and anti-mouse IgG Alexa 546 conjugated antibodies (Molecular Probes Inc Eugene, USA). The proliferation ratio was quantified in 40 islets/per animal. Results were expressed as the number of Ki67+/Insulin+ cells/ $\text{mm}^2$  per area of pancreatic islets, using Cell D for image analysis.

### 2.9. Neogenesis Study

PDX-1 expression was used as a neogenesis marker. We retrieved sections healed in citrate buffer pH 6.7 solution for 10 minutes. Samples were stained with monoclonal rabbit anti-PDX-1 antibody (Abcam, Cambridge, CB4 OFL UK). The we used a secondary biotin conjugated anti-rabbit IgG antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA), and finally revealed with a solution of 0.3 mg/ml of 3,3'-Diaminobenzidine. Results were observed qualita-

tively in 12 pancreatic areas/per animal group as number of PDX-1 positive cells/ $\text{mm}^2$  of pancreas area.

### 2.10. Ileal GLP-1 Release

GLP-1 production in ileum was analyzed by immunostaining using rabbit anti GLP-1 (Abcam, Cambridge, CB4 OFL UK) antibodies. To determine GLP-1 positive cell fraction, the number of GLP-1 positive cells and ileum total areas were quantified in 10 fields per animal. Results were noted by a single investigator and expressed as the number of GLP-1 positive cells/ $\text{mm}^2$  of ileum.

### 2.11. GLP-1 Receptor beta-cell Sensitivity

Beta-cell sensitivity to GLP-1 in pancreas was assessed by double immunostaining, using polyclonal rabbit anti-GLP-1 receptor (Abcam, Cambridge, CB4 OFL UK) and monoclonal mouse anti-insulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) antibodies. Sections were stained using anti-rabbit IgG Alexa 488 and anti-mouse IgG Alexa 546 conjugated antibodies (Molecular Probes Inc Eugene, USA). The proliferation ratio was quantified in 40 islets/per animal. The results were expressed as the ratio of GLP-1 r+/Insulin+ cells/ $\text{mm}^2$  of islet area between both groups. We used the image analysis Cell D software (Olympus, Hamburg, Germany).

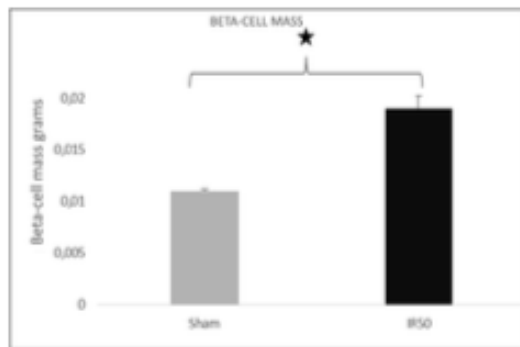
### 2.12. Statistical Analysis

Data were expressed as mean  $\pm$ SEM. Mann Whitney-U test was used to analyze differences between groups, and  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS statistical software.

## 3. RESULTS

### 3.1. Weight gaining, chow intake and basal glycaemia

Both groups of animal did not appear significant differences in these phenotypic parameters. Weight gain showed a decreased pattern from the first to the seventh day. It was probably due to surgical stress in both groups. After surgery until sacrifice, the difference of measured weight between both groups was fewer than 5%. About food intake, no significant differences were observed between Sham and IR50 groups along the study. Even both groups displayed a trend to increase slowly the volume of intake with a similar pattern. Both groups reached a usual daily intake at the end of the study.



**Fig. 2.**  $\beta$ -cell mass was represented in the Y-axis in grams for both experimental groups as means values  $\pm$ SEM expressed in grams. \* $P \leq 0.05$ . Enhanced  $\beta$ -cell mass appeared in IR50 group (0.019 $\pm$ 0.0001 vs. 0.011 $\pm$ 0.0012 grams in Sham).

The basal glycaemia test, measured weekly along the survey period, represented no significant differences between Sham and IR50 groups along the study. Meanwhile, the diabetic status of GK rats was slightly reduced in the Sham group. The animals in Sham group showed a medium 7–10% lower glycaemia, with a high SEM.

### 3.2. IR50's effect on body weight and glucose homeostasis

To further characterize glucose homeostasis, we performed an OGTT during the last week before sacrifice. Statistical differences were shown in the final studied points of the OGTT. There were differences in glucose levels at 60 and 120 minutes time-points (Fig. 1A). The area under curve (AUC) for glucose showed significant differences in glucose tolerance between both groups (Fig. 1B).

### 3.3. Changes on $\beta$ -cell population

$\beta$ -cell mass was evaluated four weeks after the surgery in paraffin embedded pancreatic tissue sections using a mouse anti-insulin antibody. This study reported an increase in  $\beta$ -cell mass in the IR50 group compared with Sham group (Fig. 2).

### 3.4. Effect of IR50 on $\beta$ -cell turnover

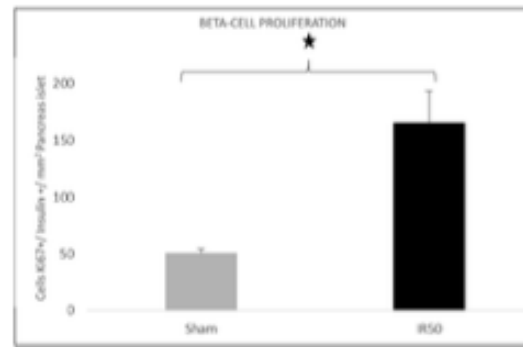
Apoptosis contribution to  $\beta$ -cell mass modification was analyzed. TUNEL and insulin simultaneous staining was used to evaluate the  $\beta$ -cell apoptosis ratio. No significant differences were found between both groups after the surgery.

To evaluate the role of cell proliferation and turnover in the observed  $\beta$ -cell mass increment after the surgery, we quantified the percentage of proliferating insulin positive cells in both groups. Proliferative  $\beta$ -cells were identified as double positive anti-insulin/Ki67 staining (Image 2). A significant increase in Ki67+/insulin+ cell number was found in GK rats with intestinal resection in relation to sham animals (Fig. 3).

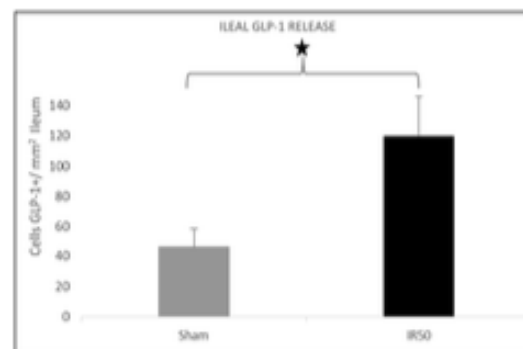
Study of PDX-1, as a neogenesis marker, showed no different expression pattern between GK rats with intestinal resection and Sham groups. No increased expression of PDX-1 positive cells was observed in IR50 group in relation to controls.

### 3.5. IR50 impact on L cells population

L cell population was measured in ileum sections from Sham and IR50 groups after the fourth week after surgery (Fig. 4). L cells were identified by staining with anti-GLP-1 antibody. GLP-1 positive cells were more than double in the IR50 group in relation to the Sham group.



**Fig. 3.** Proliferating  $\beta$ -cells four weeks after surgery.  $\beta$ -cell proliferation rate was shown as means  $\pm$ SEM where the Y-axis represents the number of Ki67+/insulin+ cells per islet area expressed in mm<sup>2</sup>. \* $P \leq 0.05$ . Data showed a significant enhancement proliferation ratio in IR50 group compared to surgical controls (50.97 $\pm$ 3.26 vs 165.60 $\pm$ 28.07 Ki67+/insulin+ cells/mm<sup>2</sup> of islet).



**Fig. 4.** Number of ileal GLP-1 positive cells is presented as means  $\pm$ SEM where the Y-axis represents the number of GLP-1 positive cells per ileum area, expressed in mm<sup>2</sup>. \* $P \leq 0.05$ . Ileum from the Sham group presented significantly lower number of GLP-1 positive cells than IR50's (46.33 $\pm$ 11.67 vs. 119.66 $\pm$ 26.60 GLP-1+ cells/mm<sup>2</sup> of ileum, respectively).

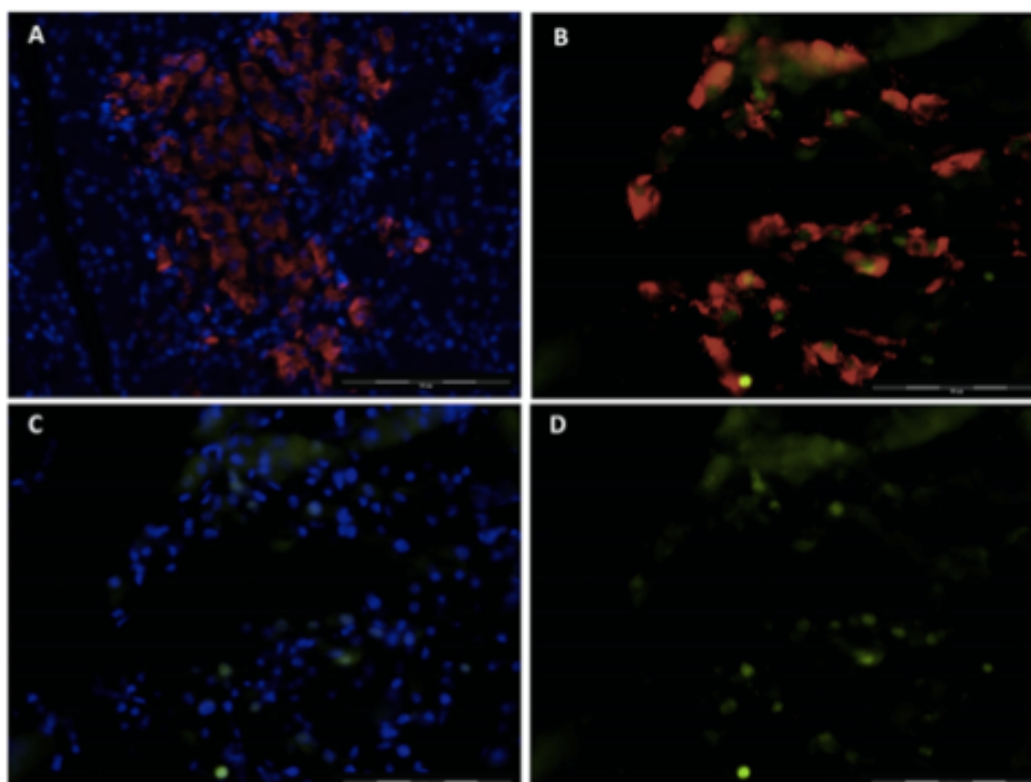
### 3.6. $\beta$ -cell sensitivity to GLP-1: expression of membrane receptor

The GLP-1 receptor expressed in  $\beta$ -cells was quantified in the pancreas sections from Sham and IR50 groups four weeks after surgery (Fig. 5). We identified a significant increased a  $\beta$ -cell area which co-labelled with GLP-1 r in the malabsorptive versus Sham group.

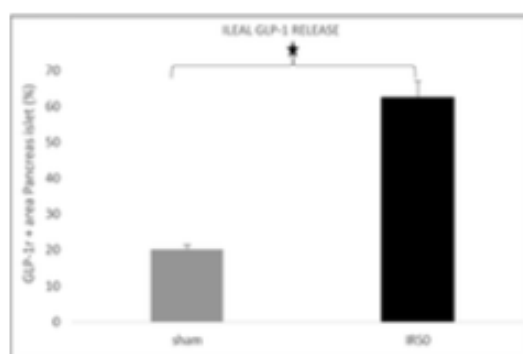
## 4. DISCUSSION

The effect of bariatric surgery on glucose homeostasis improvement is well known. Several hypotheses have been proposed to explain this fact, but the real underlying mechanisms to this improvement remain elusive. Moreover, T2DM remission could have various mechanisms implied. In order to gain insight in these mechanisms, our work used a pathogenic animal model as Goto-Kakizaki rat, which underwent resection of approximately 50% of the total length of the intestine (Collantes-Pérez et al., 2004).

Many authors have focused the explanation to this improvement of T2DM on the participation of different gastrointestinal profile. In this sense, our work might provoke a severe change in the pattern of these hormones related to the massive jejunal portion affected in the surgery. Two main hypotheses focused on diverse interpretations of the portions of the tube that are responsible for functional changes. The Foregut hypothesis, which suggested that



**Image 2.** **A. Control Sham pancreas.** The image showed a pancreatic islet, stained the cell nucleus in blue (4'-6-Diamino fenil indol –DAPI-) and colored in red the insulin reserves in  $\beta$ -cells. **B. IR50 surgical pancreas.** An islet showed an irregular aspect and shape; these unusual and non-ovoid aspect is the regular aspect that is used to present the islets pancreas of GK specimens. The image showed Ki67+ (in green) expressed in some insulin+ cells (red). **C. The image B islet.** The image showed Ki67+ (in green) expressed in some cells (nucleus in blue). **D. The image B islet** stained Ki67+ cells (in green) expressed in some cells (nucleus in blue).



**Fig. 5.** GLP-1 receptor expression in  $\beta$ -cells was quantified in the pancreas sections from Sham and IR50 groups four weeks after surgery. GLP-1 receptor expression in  $\beta$ -cells was shown in bar graphs as means  $\pm$  SEM where the Y-axis represents the GLP-1 r+/insulin + islet area expressed in percentage. \* $P \leq 0.05$ . We found a significant increased islet area  $\beta$ -cells co-labelled with GLP-1 r- in the IR50 group compared to Sham controls (61.33 $\pm$ 5.23% vs 19.16  $\pm$  19.14 GLP-1 r+/insulin + area of islet).

preventing contact of nutrients with the segment of the proximal small intestine, exerts direct antidiabetic effects by an unidentified mechanism (Rubino 2008). On the other hand, the Hindgut hypothesis, which proposed an accentuated GLP-1 release due to delivery of unabsorbed nutrients in the distal gut as antidiabetic stimulus (Youssef et al. 2014). None of these hypotheses comprise our technique, which is related to the middle portion of small bowel.

This malabsorptive surgical technique is not used in humans as a bariatric surgery. There are other variations related to the human clinic (e.g. Scopinaro) which are purely malabsorptive. However, we focused on the participation of jejunum to elucidate the precise role of this portion in the pathophysiological mechanisms of T2DM improvement.

The phenotypic parameters after surgery (basal glycaemia, weight gaining and chow intake) showed that jejunal massive resection was tolerate for animal. These parameters did not express significant differences between both groups. Although the IR50 group showed a regular decrease in the animal weight, due to a maintained malnutrition after surgery. About basal glycaemia, both surgeries can not correct the initial condition of these diabetic animals. Thus, basal glycaemia showed a diabetic status in GK rats. Basal glycaemia were slightly reduced in Sham group, probably due to statistic reasons. The mechanical aggression and malabsorptive consequences in both surgeries did not support other explanations.

We were interested in the consequences on ileum cellularity. Many authors have focused on the enterohormones, which could be related to the physiological consequences of bariatric surgery. There are many involved hormones, but we analyzed according to the cellular secretions throughout many published reports. Some non-named anti-incretin factors secreted in duodenum and jejunum were described in foregut exclusion theory (Rubino 2008; Rao and Kini 2011). These hormones were responsible for the loss of insulin production. The resection of 50% of intestine that we performed did not affect the food transit through the duodenum or proximal jejunum. So, these factors might not be implied in our experience.

Secondly, GLP-1, an enterohormone secreted by L cells in ileum, capable of increasing insulin production and  $\beta$ -cell mass as proposed by Hindgut Hypothesis (Rubino and Gagner 2002). The IR50 caused an early traffic of nutrients into distal jejunum and ileum (Tian and Jin 2016). For this reason, we analyzed the GLP-1 expression in ileal samples from IR50 and Sham groups (Fig. 4) and we found an increased number of GLP-1-positive L cells in the ileum of the IR50 group. We believe that an enhanced expression of GLP-1 could be involved in the pathophysiological changes in glucose tolerance observed in our model, according to GLP-1's effects on insulin secretion (Patrick et al. 2002). However, this does not rule out that other agents may also be involved, as the Peptide YY secreted in the ileum too (Khan et al. 2016). Other route can be that GLP-1 is not direct responsible, but only an intermediary in a Neural-Gut-Brain axis (Scarlett and Schwartz 2015).

Then we examined the effect on  $\beta$ -cell population as one of the key elements around the possible pathophysiological changes generated by the surgery. We analyzed  $\beta$ -cell mass in Sham and IR50 groups. The  $\beta$ -cell mass appeared to increase in the IR50 group in relation to the Sham group (Fig. 2). Two possible explanations can be proposed to this phenomenon: an increase on  $\beta$ -cell proliferation in pancreas (Stewart et al. 2015); or the presence of neogenesis in the pancreas that leads to an expansion of  $\beta$ -cell population through differentiation of pancreatic stem cells (Sasaki et al., 2015). This second possibility has been proposed in response to stressful situations of  $\beta$ -cell population (Wu et al., 2013). Our data supports the former and finds no arguments for the latter, since we found an increased  $\beta$ -cell proliferation rate in the IR50 group (Fig. 3), but no significant differences in PDX-1 expression.

Previous studies report an enhanced expression of PDX-1 in pancreas from GK after a RYGB (Li et al. 2015). But, the resection of 50% of the small intestine we performed is a different surgical technique, with different anatomical and physiological implications. Our surgical model had previously been tested in normoglycemic non-obese rats. With similar results we could not find differences in PDX-1 expression either (Camacho-Ramírez et al., 2017).

Besides the finding of an increased cellular synthesis of GLP-1 in the ileum, we investigated a possible difference in  $\beta$ -cells' GLP-1 sensitivity. The GLP-1 contributes to the  $\beta$ -cell population expansion. To this end, we examined the number of  $\beta$ -cells showing GLP-1 receptors in both groups. We found an increased in the GLP-1 r in the islets of IR50 group compared to Sham per islet area (Fig. 5). This result was congruent with previous reports in hyperglycemic rats. The diabetic status reduced the GLP-1 receptors in  $\beta$ -cells; and successively the glycemic correction increased these receptors in response to GLP-1 serum increase (Xu et al. 2007).

All these findings in our model suggest a complex scenario. The resection of 50% of the small intestine was related to a significant  $\beta$ -cell expansion, an increased expression of GLP-1 in ileum and increased levels of  $\beta$ -cells with GLP-1 receptors (which could be a sign of increased GLP-1 sensitivity). Nevertheless many studies support a GLP-1-independent improvement of glycaemia in mice with GLP-1 functional deletion (Rubino 2008) or GLP-1 receptor-null mice (Chambers et al. 2014) after bariatric surgeries as the SG or RYGB. However, these two techniques affect the stomach but do not exclude the jejunum. This difference suggested a physiopathological mechanism mediated by factors located at the jejunum in our model. Moreover, a recent study with Duodenal-jejunal bypass also found an improvement in diabetes control and increased L-cell expression in ileum of rats through increasing serum bile acids (Kashihara et al., 2015).

Regarding a possible mechanism to induce an increase of GLP-1 sensitivity in  $\beta$ -cell population, peptide YY (PYY) -also secreted by L cells of ileum-, could be related. PYY has been recently reported as a regulatory peptide of metabolism from isolate mouse islets. This hormone was able to control islet adaptations to insulin

deficiency/resistance through membrane receptor modifications among other mechanisms (Khan et al. 2016). A rise of PYY plasma concentrations after RYGB was documented in patients (Chronaiou et al. 2012). These facts lead us to think about PYY as the possible element to induce GLP-1 receptor overexpression in  $\beta$ -cell population after the massive resection of 50% of the small intestine. Even though, a direct effect of GLP-1 on the  $\beta$ -cells can not be discarded, as other authors reported in isolated treated islet (Xu et al. 2007).

Step by step, the physiopathological mechanisms and the controversial role of GLP-1 on diabetes improvement after bariatric surgery are being elucidated. In this way, the present study notes the important role of ileal GLP-1 production on the increased pancreatic  $\beta$ -cell mass -due to proliferation processes-, after resection of 50% of the small intestine. In addition, our data supports the importance of jejunum exclusion in the improvement of type 2 diabetes after bariatric surgery.

#### Grant support

This work was partially supported by the Research Vicerrectorado of the University of Cádiz. Ref. 20INPR0484.

#### Disclosure

The authors declare no conflict of interest. All the authors declare to know and to sign the disclosure and conflict statement. We did not receive payment or services from a third party (government, commercial, private foundation, etc.) for any aspect of the submitted work (limited to grant). We have no financial relationships (regardless of amount of compensation) with entities, which could be related to the aim of the study. We have no patents or manuscript, pending or issued, broadly relevant to this work. There are no other relationships or activities that readers could perceive to have influenced, or that give the appearance of, or potentially influencing, what we have written in the submitted work.

#### Authors contribution statement

authors 1 and 7 designed the project and realized the histological techniques; authors 2, 3 and 4, underwent surgical techniques and followed the animal survival period; authors 1, 5 and 7 participated in manuscript elaboration; author 6 analyzed the statistical procedures.

#### Acknowledgements

The authors desire to thank the laboratory technical assistance of Mrs. Adelia Gramontell Lorenzo and Mrs. Cristina Martín Ateca in the histological processes of the samples. We thank Mr. Jonathan Stuart Arthur-Jimenez for critical discussions on the manuscript and for help in corrections in the text.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.aanat.2019.01.007>.

#### References

- Alejandro, E.U., Gregg, B., Blandino-Rosano, M., Cras-Méneur, C., Bernal-Mizrachiet, E., 2015. Natural history of  $\beta$ -cell adaptation and failure in type 2 diabetes. *Mol. Aspects. Med.* 42, 19–41.
- Baggio, L.L., Drucker, D.J., 2007. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132, 2131–2157.

- Batterham, R.L., 2016. Cummings DE. Mechanisms of diabetes improvement following bariatric/metabolic surgery. *Diabetes Care* 39, 893–901, <http://dx.doi.org/10.2337/dc16-0145>.
- Breen, D.M., Rasmussen, B.A., Kokorovic, A., Wang, R., Cheung, G.W., Lam, T.K., 2012. Jejunal nutrient sensing is required for duodenal-jejunal bypass surgery to rapidly lower glucose concentrations in uncontrolled diabetes. *Nat. Med.* 18, 950–955.
- Camacho-Ramírez, A., Blandino-Rosano, M., Segundo-Iglesias, M.C., Lechuga-Sancho, A.M., Aguilar-Diosdado, M., Pérez-Arana, G.M., Prada-Oliveira, J.A., 2017. Bariatric surgery influences  $\beta$ -cell turnover in non-obese rats. *Histol. Histopathol.* 32, 1341–1350, <http://dx.doi.org/10.14670/HH-11-909>.
- Chambers, A.P., Smith, E.P., Begg, D.P., Grayson, B.E., Sisley, S., Greer, T., 2014. Regulation of gastric emptying rate and its role in nutrient-induced GLP-1 secretion in rats after vertical sleeve gastrectomy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306, 424–432.
- Chroniati, A., Tsoli, M., Kehagias, I., Leontsinidis, M., Kalfarentzos, F., Alexandrides, T.K., 2012. Lower ghrelin levels and exaggerated postprandial peptide-YY, glucagon-like peptide-1, and insulin responses, after gastric fundus resection, in patients undergoing Roux-en-Y gastric bypass: a randomized clinical trial. *Obes Surg.* 11, 1761–1770.
- Collantes-Pérez, J., Prada-Oliveira, J.A., Gomez, C., Vallo, J.J., Verastegui, C., 2004. A useful experimental model of short bowel syndrome. *J. Invest. Surg.* 17, 1–6.
- Cummings, D.E., Shannon, M.H., 2003. Ghrelin and gastric bypass: is there a hormonal contribution to surgical weight loss? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 2999–3002.
- Drucker, D.J., 2003. Glucagon-like peptide 1 and the islet  $\beta$ -cell: augmentation of cell proliferation and inhibition of apoptosis. *Endocrinology* 144, 5145–5148.
- Garibay, D., McGavigan, A.K., Lee, S.A., Ficorilli, J.V., Cox, A.L., Michael, M.D., 2016.  $\beta$ -Cell glucagon-like peptide-1 receptor contributes to improved glucose tolerance after vertical sleeve gastrectomy. *Endocrinology* 157, 3405–3408.
- Kashihara, H., Shimada, M., Kurita, N., Sato, H., Yoshikawa, K., Higashijima, J., Chikakiyo, M., Nishi, M., Takasu, C., 2015. Duodenal-jejunal bypass improves diabetes and liver steatosis via enhanced glucagon-like peptide-1 elicited by bile acids. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 30, 308–315.
- Khan, D., Vasu, S., Moffett, R.C., Irwin, N., Flatt, P.R., 2016. Islet distribution of Peptide YY and its regulatory role in primary mouse islets and immortalized rodent and human  $\beta$ -cell function and survival. *Mol. Cell Endocrinol.* 436, 102–113.
- Li, Z., Zhang, H.Y., Lu, L.X., Li, D.F., Dai, J.X., Sha, O., Li, W.Q., Bai, Y., Yuan, L., 2015. Roux-en-Y gastric bypass promotes expression of PDX-1 and regeneration of  $\beta$ -cells in Goto-Kakizaki rats. *World J. Gastroenterol.* 16, 2244–2251.
- Mokadem, M., Zechner, J.F., Margolskee, R.F., Drucker, D.J., Aguirre, V., 2013. Effects of Roux-en-Y gastric bypass on energy and glucose homeostasis are preserved in two mouse models of functional glucagon-like peptide-1 deficiency. *Mol. Metab.* 3, 191–201.
- Penney, N.C., Kinross, J., Newton, R.C., Purkayastha, S., 2015. The role of bile acids in reducing the metabolic complications of obesity after bariatric surgery: a systematic review. *Int. J. Obes.* 39, 1565–1574.
- Pories, W.J., Swanson, M., McDonald, K.G., 1995. Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult onset diabetes mellitus. *Ann. Surg.* 222, 339–350.
- Rao, R.S., Kini, S., 2011. GIP and bariatric surgery. *Obes. Surg.* 21, 244–252.
- Rubino, F., Gagner, M., 2002. Potential of surgery for curing type 2 diabetes mellitus. *Ann. Surg.* 236, 554–559.
- Rubino, F., 2008. Is type 2 diabetes an operable intestinal disease? A provocative yet reasonable hypothesis. *Diabetes Care.* 31, 290–296.
- Sasaki, S., Miyatsuka, T., Matsuoka, T.A., Takahara, M., Yamamoto, Y., Yasuda, T., Kaneto, H., Fujitani, Y., German, M.S., Akiyama, H., Watada, H., Shimomura, I., 2015. Activation of GLP-1 and gastrin signalling induces in vivo reprogramming of pancreatic exocrine cells into  $\beta$ -cells in mice. *Diabetologia* 58, 2582–2591.
- Scarlett, J.M., Schwartz, M.W., 2015. Gut-brain mechanisms controlling glucose homeostasis. *F1000 Prime Rep.* 7, 12.
- Smith, S.C., Edwards, C.B., Goodman, G.N., 1996. Changes in diabetic management after Roux-en-Y gastric bypass. *Obes. Surg.* 6, 345–348, <http://dx.doi.org/10.1381/096089296765556674>.
- Stewart, A.F., Hussain, M.A., García-Ocaña, A., Vasavada, R.C., Bhushan, A., Bernal-Mizrachi, E., Kulkarni, R.N., 2015. Human  $\beta$ -cell proliferation and intracellular signaling: part 3. *Diabetes* (64), 1872–1885.
- Tian, L., Jin, T., 2016. The incretin hormone GLP-1 and mechanisms underlying its secretion. *J. Diabetes* (8), 753–765, <http://dx.doi.org/10.1111/1753-0407.12439>.
- Wang, P.Y., Caspi, L., Lam, C.K., Chari, M., Li, X., Light, P.E., 2008. Upper intestinal lipids trigger a gut-brain-liver axis to regulate glucose production. *Nature* 452, 1012–1016.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H., 2004. Global prevalence of diabetes estimated for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27, 1047–1053.
- Wu, F., Guo, L., Jakubowski, A., Su, L., Li, W.C., Bonner-Weir, S., Burkly, L.C., 2013. TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) promotes  $\beta$ -cell neogenesis from pancreatic ductal epithelium in adult mice. *PLoSOne* 8, e72132.
- Xu, G., Kaneto, H., Ross-Laybutt, D., Duvivier-Kali, V.F., Trivedi, N., Suzuma, K., King, G.L., Weir, G.C., Bonner-Weir, S., 2007. Downregulation of GLP-1 and GIP receptor expression by hyperglycemia. Possible contribution to impaired incretin effects in diabetes. *Diabetes* (56), 1551–1558.
- Yousseif, A., Emmanuel, J., Karra, E., Millet, Q., Elkalaawy, M., Jenkinson, A.D., 2014. Differential effects of laparoscopic sleeve gastrectomy and laparoscopic gastric bypass on appetite, circulating acyl-ghrelin, peptideYY3-36 and active GLP-1 levels in non-diabetic humans. *Obes. Surg.* 24, 241–252.