



Cuantificación de la masa de células beta en páncreas de ratas diabéticas sometidas a cirugía bariátrica

Alumno: Carolina España Domínguez.

Estudiante de 6º Curso de Medicina.

Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz.

Tutor/a: María del Carmen Carrasco Molinillo.

Departamento de Anatomía y embriología.

JUNIO 2015

ÍNDICE:

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	3
2. ABSTRACT AND KEYWORDS	4
3. INTRODUCCIÓN	5
4. MATERIAL Y MÉTODO	12
4. A. Animales	12
4. B. Intervenciones quirúrgicas	13
4. C. Sacrificio	16
4. D. Procesamiento de las muestras anatómicas	17
4. E. Procesamiento de las muestras histológicas	17
4. F. Estudio de la masa celular beta	18
4. G. Estrategia de análisis estadístico	22
5. RESULTADOS	23
6. DISCUSIÓN	29
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. RESUMEN.

La cirugía bariátrica engloba una serie de técnicas cuyo objetivo es el descenso de la ingesta calórica o absorción de nutrientes, mediante la alteración quirúrgica del tubo digestivo. Es una importante herramienta terapéutica ante la obesidad y actualmente se considera también una alternativa terapéutica a la diabetes mellitus tipo 2, denominándose cirugía metabólica cuando persigue tal fin. Pero poco se sabe de los cambios que se producen en el páncreas endocrino y que permiten la remisión de la diabetes tras la cirugía. Este grupo de investigación se ha centrado en la resección del cincuenta por ciento del intestino delgado para representar los efectos que dicha cirugía tiene sobre el páncreas, dado los resultados obtenidos con ratas sanas en un estudio previo. Dicho trabajo demuestra que tras doce semanas de esta cirugía se produce un aumento de la masa celular beta, por un incremento de los procesos de proliferación. En el estudio actual hemos repetido la experiencia con ratas diabéticas tipo 2 y normopesas. Se han llevado a una supervivencia de cinco semanas tras la resección del cincuenta por ciento del intestino. Para estudiar los efectos de la cirugía sobre el páncreas endocrino, hemos cuantificado la masa celular beta pancreática y analizado su histomorfometría mediante inmunofluorescencia anti-insulina. Nuestros resultados no han mostrado diferencias estadísticamente significativas entre el grupo estudio y su control, en los parámetros analizados, pero sí una tendencia al aumento en la masa celular beta de las ratas intervenidas mediante resección del cincuenta por ciento. Esto puede deberse, bien a las limitaciones de nuestro trabajo, o a que es preciso un mayor tiempo de supervivencia para que los efectos desencadenados por la cirugía influyan en los procesos celulares. **PALABRAS CLAVE:** Diabetes mellitus tipo 2, cirugía bariátrica, masa celular beta, resección intestinal del cincuenta por ciento.

2. ABSTRACT.

Bariatric surgery includes a series of surgical techniques aimed at the decrease in caloric intake or absorption of nutrients through the digestive tract via surgical alteration. This is an important therapeutic tool against obesity and currently is also considered an alternative therapy for type 2 diabetes mellitus, which are called metabolic surgery when pursuing this end. But little is known about the changes occurring in the endocrine pancreas and allow the remission of diabetes after surgery. Our research group has focused on the removal of fifty percent of the small intestine to represent the effects on the pancreas by this surgery, given the results obtained with healthy rats in a previous study. This work demonstrates an increased pancreatic beta cell mass after twelve weeks of bariatric surgery, at the expense of increased proliferation processes. In the current study we repeated the experience with rats, which are normal-weight type 2 diabetes. They have led to a five-week survival after intestine resection of fifty percent. To study the effects on the endocrine pancreas we quantified pancreatic beta cell mass and have analyzed their anti-insulin histomorphometry by immunofluorescence. Our results showed no statistically significant differences between the study group and control group in the parameters analyzed, but an upward trend in the beta cell mass of rats which have undergone resection of fifty percent of the small intestine. This may be due either to the limitations of our work, or that need a longer survival for the enterohormonal effects triggered by bariatric surgery on cellular processes.

KEYWORDS: Diabetes mellitus type 2, bariatric surgery, beta-cell mass, intestinal resection fifty percent

3. INTRODUCCION.

La diabetes mellitus (DM) es una entidad clínica metabólica producida por un fallo en la regulación de la glucosa. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) La diabetes afecta a más de 347 millones personas en el mundo y según sus previsiones, será la séptima causa de muerte en el 2030 [1].

Ello la convierte en una de las entidades clínicas con mayor impacto sociosanitario, no sólo por su alta prevalencia, sino también por las complicaciones agudas y crónicas que produce, entre las que se encuentran la cetoacidosis diabética, el coma hiperosmolar, las enfermedades cardiovasculares, retinopatía, neuropatía y nefropatía. Y también por su elevada tasa de mortalidad [2].

El 90% de los casos mundiales de diabetes son tipo 2 (DM2), la cual se asocia con un peso corporal excesivo e inactividad física. Su base es la pérdida progresiva de sensibilidad a la insulina por parte de los tejidos periféricos: hígado, músculo esquelético y grasa. Lo cual conlleva niveles altos de glucosa de forma mantenida que terminan sobrepasando la capacidad de las células beta pancreáticas, responsables de la producción y secreción de insulina [1].

Estos datos explican la revolución que significó el descubrimiento del potencial de la cirugía bariátrica (CB) como alternativa terapéutica a la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) [3].

La CB engloba una serie de técnicas quirúrgicas que tienen como objetivo el descenso de la ingesta calórica o absorción de nutrientes, mediante la alteración quirúrgica del tubo digestivo, provocando una reducción ponderal en los pacientes intervenidos. Se trata de una importante herramienta terapéutica frente a la obesidad, definida por la OMS como la presentación de un índice de masa corporal mayor de 30

[4], y se lleva utilizando con tal fin desde principios del siglo XX, tal como expresó Brenizer ya en 1929 [5] y recogió Buchwald et al en 2004, en su revisión sistemática y metanálisis sobre este tipo de cirugía [6]

Estas técnicas quirúrgicas se dividen en tres tipos según la alteración que se realiza sobre el aparato digestivo:

- Restrictivas: se realiza una disminución del volumen gástrico, lo que conlleva una reducción de la ingesta y un menor aporte de calorías al organismo, obligando al mismo a utilizar sus reservas energéticas del tejido graso. La gastrectomía vertical es la más utilizada.
- Técnicas malabsortivas: se persigue reducir la absorción de nutrientes por parte del tubo digestivo, por lo que en todas ellas se realiza modificaciones en el intestino delgado. La más utilizada es la derivación biliopancreática [6]. Se pueden incluir también en este grupo aquellas cirugías indicadas en diferentes enfermedades, como la enterocolitis necrotizante y la atresia intestinal en niños, o la enfermedad de Crohn, la enteritis actínica y los infartos mesentéricos en adultos. Ya que suponen una resección masiva del intestino delgado que es bien tolerada sin necesidad de aportes nutricionales, siempre y cuando la sección de intestino delgado resecada no supere el 50% de la longitud total del mismo [7].
- Técnicas mixtas: esta técnica combina ambos efectos, los restrictivos y los malabsortivos, siendo la más aplicada el Bypass-gástrico [6].

Debido a que la comorbilidad entre obesidad y DM2 es muy elevada, muchos de los pacientes obesos que fueron intervenidos mediante técnicas de CB presentaban de forma simultánea DM2 antes de ser intervenidos, lo cual permitió un hallazgo

inesperado: estos pacientes obesos y diabéticos presentaron una mejoría clínica en lo referente a niveles de glucemia y necesidades de insulina, incluso antes de que hubiese comenzado la pérdida de peso. Efecto analizado en el metanálisis de Buchwald 2009 [8].

Esto ha llevado a que hoy en día la aplicación de la cirugía bariátrica como herramienta terapéutica de la DM2 sea una realidad, tal y como contempla el posicionamiento de 2013 de las Sociedades Españolas de Endocrinología y Nutrición (SEEN), de Cirugía de la Obesidad Mórbida y Enfermedades Metabólicas (SECO), y la de Diabetes (SED). Usando el término de cirugía metabólica para los procedimientos quirúrgicos encaminados al tratamiento de la DM2 y de los factores de riesgo cardiometabólicos susceptibles de mejoría [9].

Pero muy poco se sabe sobre los posibles mecanismos fisiopatológicos que pueden estar mediando esta respuesta en los sujetos diabéticos intervenidos. El estudio de estos mecanismos en animales de experimentación ha establecido las siguientes teorías principales como respuesta:

- Teoría de la grelina: La grelina es producida principalmente por el estómago, pero también en otros órganos, como el páncreas. Su principal función es estimular el apetito. La hipótesis de la grelina postula que el compromiso en la secreción de esta hormona causada por la CB que afecta al estómago tiene efectos sobre la homeostasis de la glucosa [10].
- Teoría del intestino proximal (Forgut exclusión theory): defiende que la ausencia de paso de los alimentos a nivel duodeno-yeyunal proximal produce un aumento de las incretinas y su consecuente mejoría en la producción y acción de la insulina. Las incretinas (GIP y GLP-1) son hormonas producidas en

el tracto gastrointestinal en respuesta a la ingesta de alimentos y que producen efectos sobre las células de los islotes de Langerhans y los tejidos periféricos.

Este efecto anti-diabetogénico se debería a que este salto en el tránsito intestinal normal evitaría la secreción/estimulación de una señal (señales anti-incretinas) contrarreguladora del efecto incretina, para evitar hipoglucemias, y que se supone aumentada en la DM2 [11].

- Teoría del intestino distal (Hindgut hipótesis): defiende que la ausencia de paso de los alimentos a nivel duodeno-yeyunal proximal y el contacto prematuro de los alimentos con el íleon es responsable de una elevación en la liberación de GLP-1 junto a otras enterohormonas, contribuyendo a la mejora de la secreción de insulina y su acción, así como a una saciedad precoz y una disminución de la ingesta. [12]

Estas hipótesis explican que enterohormonas pueden estar detrás de los efectos positivos de la CB sobre la homeostasis de la glucosa. Pero no, que modificaciones producen dichas enterohormonas u otros factores, en el páncreas endocrino, las cuales son imprescindibles para que se produzca esta mejoría de la DM2 y están aún sin esclarecer.

Analizando de nuevo la patogénesis de la DM2, el agotamiento de la célula beta pancreática termina provocando una reducción de la masa celular beta, por aumento de la apoptosis (muerte celular programada) y descenso en los procesos de proliferación (replicación de las células de islotes existentes) y neogénesis (diferenciación de las células de los islotes a partir de células precursoras y epiteliales ductales) tanto en humanos como animales. [13, 14].

Estos mecanismos, proliferación/apoptosis/neogénesis, están implicados en el turnover fisiológico de los islotes pancreáticos para permitir la adaptación de la masa beta a diferentes situaciones, tanto fisiológicas (desarrollo embriológico, embarazo), como patológicas (obesidad, pancreatitis necrotizante), asegurando una adecuada función celular y un correcto control glucémico, pero este equilibrio se ve alterado en la DM2 [15, 16]. Por lo que la CB debe producir efectos sobre esta renovación celular que medie modificaciones en la población de células beta que permitan una producción y secreción efectivas de insulina para el correcto control glucémico [17].

Pero los estudios que profundizan en el efecto de esta cirugía sobre el páncreas endocrino son escasos y solo hemos encontrado uno en el que se utilice la masa celular beta como parámetro para valorar los posibles cambios ocurridos en el tejido pancreático tras CB, ciñéndonos a la definición exacta de masa celular beta, que precisa de la observación multifactorial del área de los islotes, del tejido pancreático y del peso del páncreas [18].

Esta medición de la masa celular beta, es un cómputo inferido de cuánto pesarían todas las células beta de un páncreas y es una medida indirecta de los procesos de recambio celular. Ya que la masa de células beta en ratas depende, al igual que en el humano del ratio proliferación/apoptosis/neogénesis [13, 19].

El grupo de investigación en el que me integro, ya cuenta con trabajos en esta línea. En el último se utilizaron ratas Wistar normopesas, no diabéticas, para que los cambios que se observasen pudieran ser interpretados como un efecto directo de la propia intervención [20]. Los animales fueron sacrificados a los tres meses tras las intervenciones y se comparó el efecto en la masa celular beta tras la aplicación de los diferentes tipos de CB. Para representar las técnicas restrictivas se utilizó la

Gastrectomía vertical, para las mixtas el Bypass-gástrico y para la cirugía malabsortiva se aplicó una técnica experimental que consiste en la resección intestinal del cincuenta por ciento del intestino delgado (RI50) ya descrita en la bibliografía [21].

Los resultados obtenidos demostraron que la aplicación de una CB con componente malabsortivo, en ratas normopesas y sanas provoca cambios en los islotes pancreáticos con aumento de la masa beta de forma estadísticamente significativa y orientando hacia mecanismos de proliferación como base de dicho efecto. Los cuales se expresan con más fuerza cuanto mayor fue el componente malabsortivo de la técnica utilizada, o por lo menos en los periodos de supervivencia estudiados. Y estos cambios se correlacionan con la expresión de una intolerancia a la glucosa en las pruebas funcionales de forma temprana y mantenida en el tiempo [20].

Estos resultados han llevado a este grupo de investigación a resaltar la importancia del segmento yeyunal como responsable de modificaciones en el eje entero-insular y a proponer este descubrimiento como efecto de la teoría del intestino medio (Middlegut), frente a las hipótesis que centran la atención en las porciones proximales (Foregut) y/o distales (Hindgut).

En este nuevo trabajo se ha extrapolado la técnica RI50 a ratas Goto-Kakizaki (GK), consideradas el mejor modelo animal espontáneo no obeso de DM2. Se trata de un modelo que se desarrolló en los años 90 mediante cruces endogámicos recurrentes de ratas no diabéticas (Wistar), pero con niveles plasmáticos de glucosa en el límite alto de la normalidad. Dicho modelo reproduce bien las principales características de la DM2 humana [22].

Nuestro objetivo es investigar los posibles efectos de esta cirugía malabsortiva RI50 sobre la masa celular beta de un páncreas diabético, mediante la cuantificación y

análisis de su histomorfometría. Ya que el estado previo del roedor (sano, obeso y/o DM2), pueden potenciar/minimizar los mecanismos de las hormonas gastrointestinales, que puedan a su vez acelerar o modificar -cuantitativa y/o cualitativamente- los resultados histomorfofuncionales del páncreas y la regulación de la glucosa.

Se han llevado a una supervivencia de cinco semanas porque se sospecha que los resultados obtenidos en el estudio anterior pueden corresponder a cambios en el páncreas endocrino en periodos tempranos tras la cirugía.

En caso de confirmarse nuestra hipótesis: La intervención quirúrgica mediante cirugía bariátrica malabsortiva tipo R150 en ratas diabéticas tipo GK, provocará cambios en la masa celular beta pancreática de dichos animales. Se centraría la importancia del segmento yeyunal en la homeostasis de la célula beta pancreática, incluso en animales diabéticos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio ha sido realizado en las instalaciones del Animalario de la Universidad de Cádiz, el Departamento de Anatomía y Embriología de la Facultad de Medicina de Cádiz y la Unidad de Investigación del Hospital Puerta del Mar. Se trata de un estudio experimental de evaluación de una intervención con grupo control y ha tenido una duración de 7 meses (noviembre 2014-mayo 2015).

El grupo de trabajo, en el cual participo, cuenta con aprobación del **Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Cádiz**, según el R.D. 1201/2005, para esta línea de investigación. Aprobación que se mantendrá vigente hasta el 2018 según establece la disposición transitoria segunda de la legislación vigente actual (R.D. 53/2013).

4. A. Animales.

Se han empleado **16 ratas GK machos** suministradas por el Servicio de Producción y Experimentación Animal (SEPA) de la Universidad de Cádiz y todas ellas han sido mantenidas en un mismo ambiente de estabulación acorde a su ritmo circadiano habitual, sin estrés y con dieta normal.

Para esta experiencia hemos elegido ratas machos para evitar sesgos de hormonas sexuales femeninas. Estas ratas presentaban un peso de 200-250 gramos, que es el peso apto para someterlas a cirugía y una edad de 3 a 6 meses desde el nacimiento, suficiente para que se hayan desarrollado los efectos de la DM2 [23]. Estos parámetros dependen fundamentalmente de la disponibilidad del SEPA. Las 16 ratas se dividirán en dos grupos de 8 sometiendo a cada uno de ellos a diferentes técnicas quirúrgicas: un grupo control quirúrgico y un grupo quirúrgico.

4. B. Intervenciones quirúrgicas:

En el momento de la intervención los 16 machos GK utilizados eran adultos-jóvenes de aproximadamente 200-250 gr y presentaban niveles de glucemia basal elevados mantenidos en el tiempo.

En el período preoperatorio se les sometió a doce horas de ayuno. Fueron anestesiados con gas volátil (isoflurano 3%, Abbott 571329.8) y se les realizó una laparotomía en el tercio medio abdominal, que permitió la identificación del ángulo de Treitz y de la válvula íleo-cecal como referencias anatómicas para la exposición de todas las asas de intestino delgado en forma de abanico y permitir así su medición.

A partir de este momento la técnica quirúrgica fue diferente según si el animal formaría parte del grupo de estudio (n=8) o del grupo control (n=8), asignación que se realizó de forma aleatoria.

Grupo estudio. **Resección Intestinal del 50% (R150)**: resección del cincuenta por ciento del intestino delgado, preservando el 25 % distal al ángulo de Treitz y el 25 % proximal a la válvula ileo-cecal. Se resecó también la porción de mesenterio que acompaña a esta pieza intestinal y la arcada vascular que la nutre y se realizó una anastomosis termino-terminal mediante sutura con puntos sueltos (Vycril® 4/0). Antes del cierre se instiló suero fisiológico a la cavidad abdominal (Figura 1).

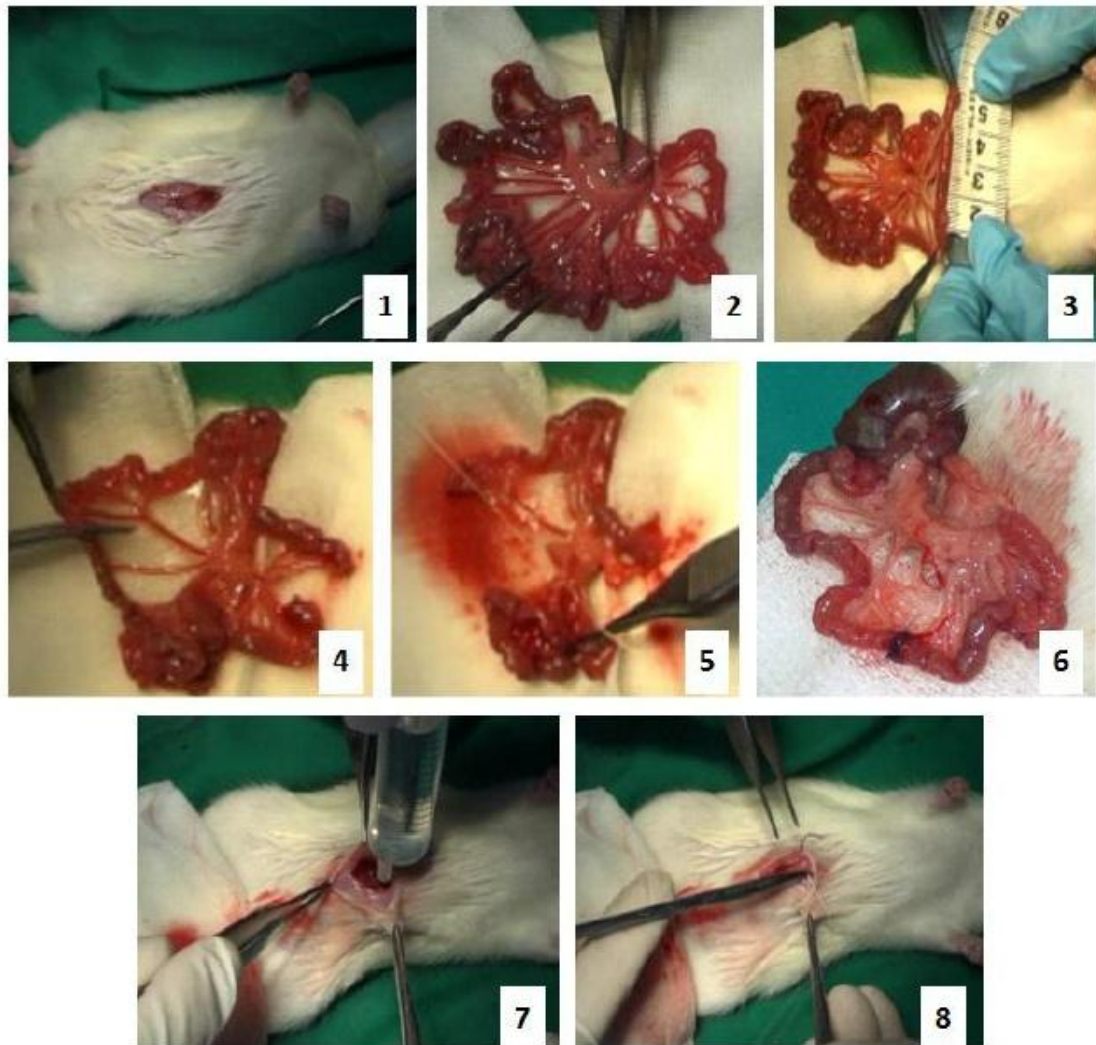


Imagen1. Secuencia de pasos durante la cirugía de las ratas pertenecientes al grupo RI50. 1. Rata anestesiada con la mascarilla e incisión abdominal en línea media de unos 3 cm. 2. Exposición de las asas de delgado. 3. Medición de todo el intestino delgado. 4. Enterotomía transversal proximal (ya realizada) y distal (la que se observa en la foto) para extirpar la zona media del intestino delgado. 5. Ligadura del mesenterio con ligadura única. 6. Anastomosis, obsérvese el ojal mesentérico que queda tras la exéresis del intestino. 7. Instilación de suero salino fisiológico. 8. Cierre de la pared abdominal. Fuente: Alonso 2015[20]

Grupo control. **Cirugía tipo Sham**: sección transversal en la zona media del intestino delgado, sin resección y su posterior anastomosis termino-terminal mediante sutura con puntos sueltos (Vycril® 4/0) (Figura 2).

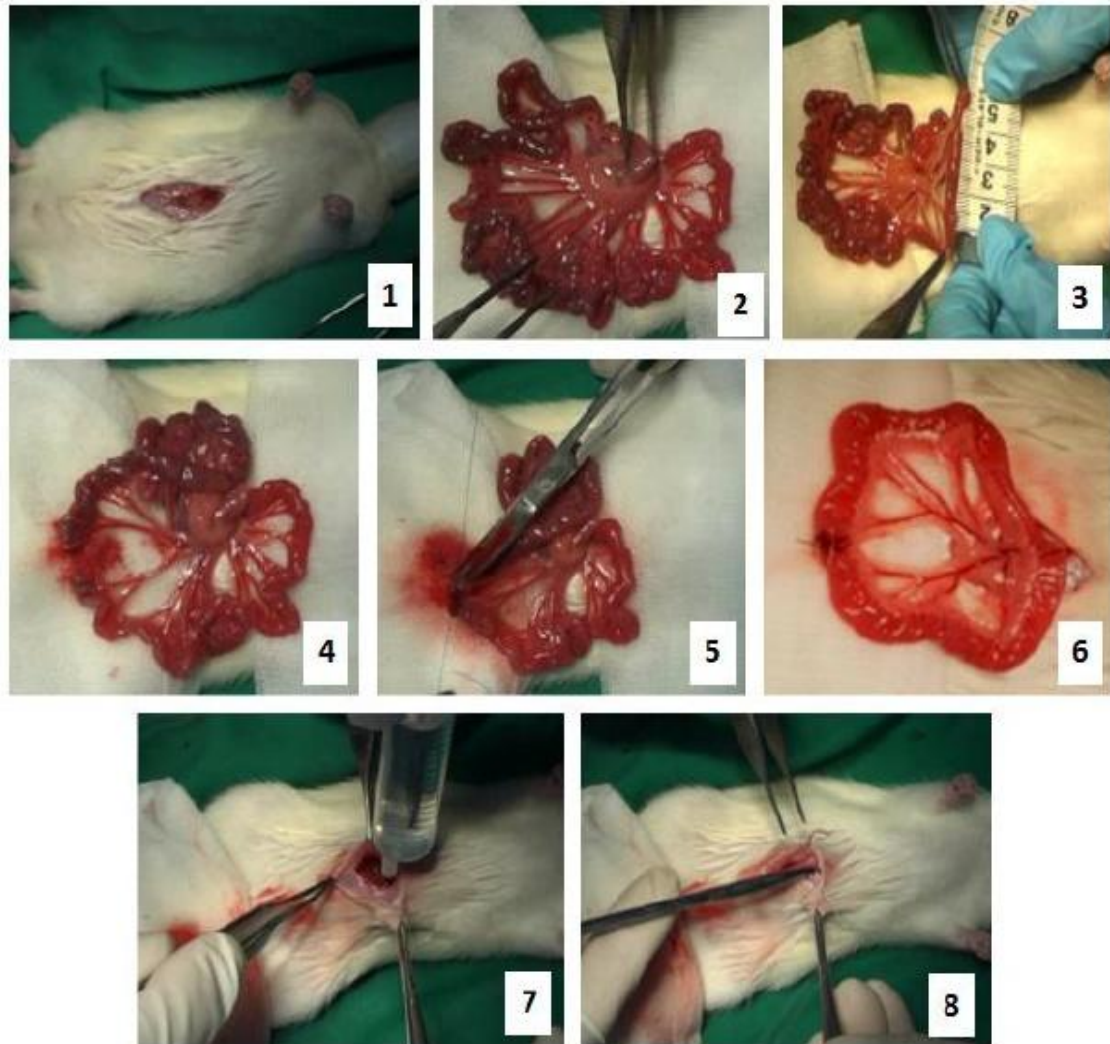


Imagen 2. Secuencia de pasos durante la cirugía de las ratas pertenecientes al grupo control quirúrgico (Sham) 1. Rata anestesiada con la mascarilla e incisión abdominal en línea media. 2. Exposición de las asas de delgado. 3. Medición de todo el intestino delgado 4. Enterotomía transversal, sin resección intestinal. 5. Enterorrafia con puntos sueltos. 6. Anastomosis. 7. Instilación de suero salino fisiológico. 8. Cierre de la pared abdominal. Fuente: Alonso 2015 [20].

En ambos grupos el cierre de la pared abdominal se realizó en un solo plano, incluyendo piel con sutura continua (Vycril® 3/0). En las primeras 12 horas del periodo postoperatorio sólo recibieron agua y posteriormente la dieta se fue incrementando pasando de líquida a la dieta estándar.

Tras el primer día de la cirugía y durante las cinco semanas siguientes, se realizaron mediciones de la ingesta de alimento, del peso, de la glucemia basal, de la insulinemia basal y se les realizó una sobrecarga oral de glucosa.

4. C. Sacrificio.

Cinco semanas después de las intervenciones quirúrgicas todos los animales fueron sacrificados mediante hidrato de cloral intraperitoneal a una dosis letal (200mgr /kgr) para evitar el dolor innecesario, tal y como indica la normativa vigente (Real Decreto 53/2013, sobre Protección de los Animales Utilizados para Experimentación y otros Fines Científicos, incluida la docencia).

Tras la sedación se realizará una laparotomía en cruz abdominal asociando una toracotomía paraesternal derecha e izquierda con exposición del mediastino y el corazón.

Para evitar la coagulación precoz en el compartimento intravascular se inyectará 3 UI de heparina en el ventrículo izquierdo mientras el animal continúa con ritmo sinusal. Se introducirá un catéter de 14 Frech en el ventrículo izquierdo hasta la aorta ascendente y a través de él se perfundirá una solución de Líquido de Bouin y Formalina para fijar los tejidos que posteriormente se extraerán. Tras la perfusión y la fijación, se procederá a la extracción de los páncreas.

4. D. Procesamiento de las piezas anatómicas.

Tras su extracción y pesado en báscula de precisión, los páncreas fueron inmediatamente fijados en solución de Bouin durante doce horas a 4º. Después se procedió a una postfijación de sumersión veinticuatro horas en formalina (paraformaldehído al 37% P/V a 4ºC) a 4º. La deshidratación se realizó mediante una secuencia de pasos progresivos de 45 minutos en solución de alcoholes creciente de 70º a alcohol absoluto y xilol. Y tras ello se procedió a la inclusión en parafina de las muestras.

Los bloques de parafina se ordenaron, etiquetaron y clasificaron asignándoles números correlativos, sin poder conocer así, a qué tipo de cirugía habían sido sometidos esos animales.

4. E. Procesamiento de las muestras histológicas e inmunohistoquímica para marcaje de insulina y núcleos celulares.

Los páncreas incluidos en parafina se cortaron mediante microtomo a 8 micrometros (μm) y se montaron en portas. Se seleccionaron dos portas de cada páncreas con una diferencia de 100 μm entre ellos para asegurar que fueran representativas del total de la pieza. Como el páncreas se introdujo extendido en la parafina, en cada porta de los seleccionados para continuar el estudio, se consiguió poseer toda la superficie del mismo.

La desparafinación y rehidratación se consiguió mediante una secuencia de pasos progresivos de 5 minutos en xilol y alcoholes decrecientes desde alcohol absoluto a 70º. Tras lo cual se realizaron dos lavados en tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4) para estabilizar los tejidos. Se incluyeron en una solución de Tritón X-100 al 0,2%

P/V a temperatura ambiente durante treinta minutos, para la permeabilización de las membranas celulares de la muestra, tras lo cual se volvió a realizar un lavado en PBS.

Para el marcaje inmunohistoquímico de la **insulina** los portales se incubaron con un anticuerpo IgG monoclonal de ratón anti-insulina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) durante doce horas a 4°C, según instrucciones del proveedor. El revelado se obtuvo con el anticuerpo anti-IgG de ratón anti-insulina conjugado con un **fluoróforo** (Alexa 546) incubándose durante una hora a temperatura ambiente. Por último, los **núcleos** celulares fueron teñidos con 4'-6'-Diamino fenil-indol (DAPI) en medio de montaje DABCO (1:1000 Volumen/Volumen (V/V)).

4. F. Estudio de la masa celular beta pancreática y su histomorfometría.

❖ Estudio de la masa celular beta pancreática.

Para establecer la masa beta pancreática es preciso el análisis de tres parámetros: Área insulina positiva, área de la sección del páncreas y peso total del páncreas.

- **Área insulina positiva:** se empleó un microscopio de fluorescencia (20x) que posee una cámara digital Olympus DP71 acoplada, para permitir el análisis con el software para tratamiento de imágenes Cell-D®. Se rodeó manualmente, usando un ratón informático, cada una de las áreas insulina positiva y el propio programa halló el valor de cada una de estas áreas en micrómetros cuadrados (μm^2), que se transformaron a milímetros cuadrados (mm^2). Se encontraron un número mínimo de 60 y máximo de 290 de áreas, por cada sección de páncreas. Tras ello se procedió al sumatorio de dichas áreas por sección de páncreas analizado.

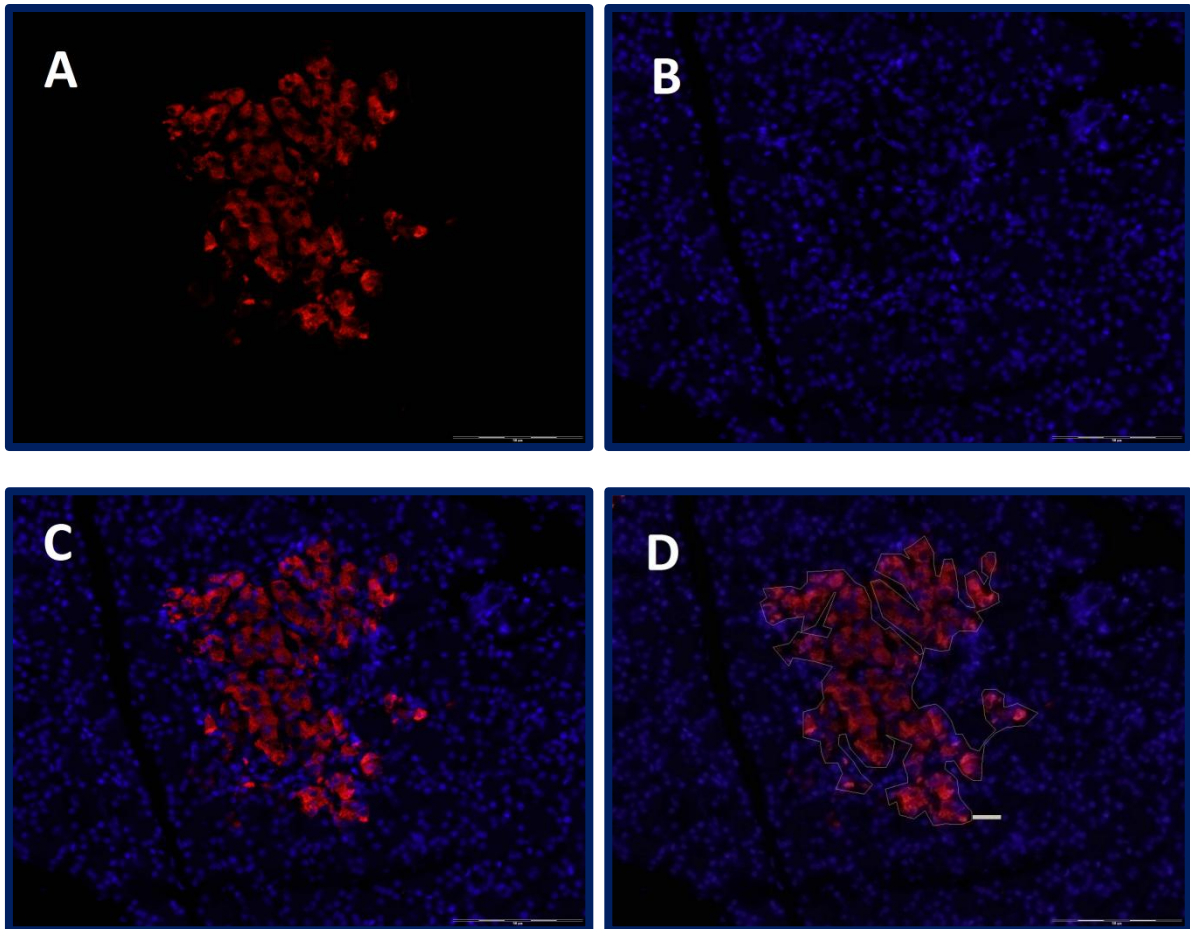


Imagen 3: Células beta marcadas en rojo mediante técnica inmunohistoquímica anti-insulina revelados con fluoróforo (Alexa 546). Núcleos marcados en azul con 4'-6'Diamino fenil-indol (DAPI). La secuencia representa el proceso empleado para el cálculo del área insulina positiva de cada islote con fotos 20X. 3.A (INSULINA+): representa el marcaje en rojo de las reservas de insulina intracitoplasmáticas, por lo tanto, nos pone de manifiesto los islotes pancreáticos. 3.B (DAPI): representa todos los núcleos celulares del tejido pancreático, en azul. 3.C (INSULINA+DAPI): Esta imagen es un montaje de las imágenes A y B, y podemos ver el citoplasma del islote pancreático en rojo (INSULINA+) y sus núcleos en azul (DAPI+). 3.D Área insulina positiva: usando como base la imagen C, rodeamos con un ratón informático manual el área insulina positiva.

- **Área de sección pancreática:** se escanearon las secciones de tejido pancreático montado en los portas mediante el escáner Nikon Supercoolscan®, las imágenes de los portas fueron guardadas y se analizaron con el software del programa Image J®. Se rodeó manualmente usando un ratón informático el área de muestra histológica que correspondía a tejido pancreático y el propio programa haya el valor de dicha área en μm^2 que se transformaron a mm^2 .

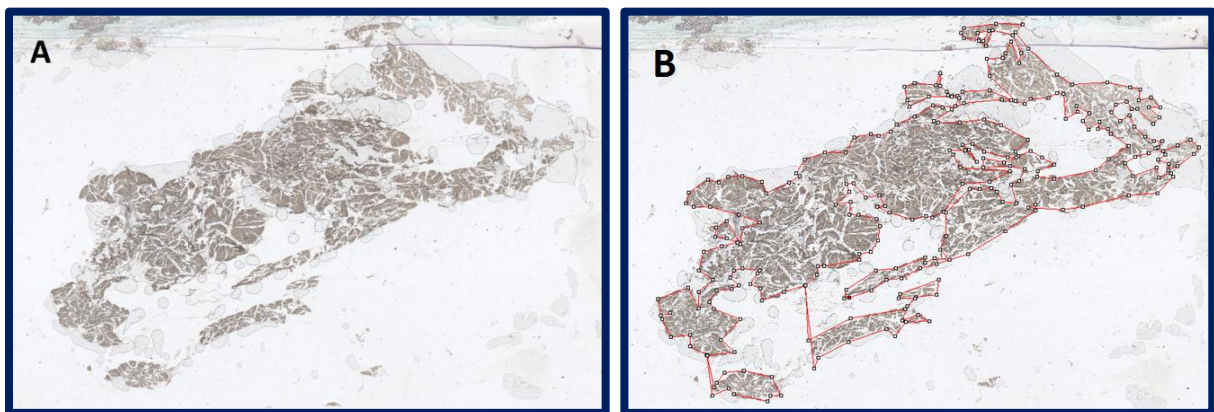


Imagen 4: Secciones de páncreas cortados mediante micrótopo a $8 \mu\text{m}$. La secuencia representa el proceso empleado para el cálculo del área de sección de páncreas total. 4. A sección de páncreas montado en porta. 4. B. Área de sección de páncreas: rodeamos con un ratón informático manual el área insulina positiva.

- **Peso páncreas:** En el momento del sacrificio, tras la extracción, los páncreas fueron pesados en una báscula de precisión y el resultado fue archivado en la ficha de datos de cada pieza en miligramos (mg).

Tras la obtención de cada uno de estos parámetros se halló el ratio Área pancreática insulina positiva/Área total pancreática y al valor resultante se le multiplicó el peso del páncreas, obteniendo así la masa beta pancreática de cada uno de los animales del estudio expresada en mg.

❖ **Número de islotes de células beta pancreática en milímetros cuadrados (mm²)**

Para este análisis se utilizaron los siguientes parámetros:

- **Número de islotes de células beta pancreática:** se empleó un microscopio de fluorescencia (20x) que posee una cámara digital Olympus DP71 acoplada, para permitir el análisis con el software para tratamiento de imágenes Cell-D®. Se rodeó manualmente usando un ratón informático cada una de las áreas insulina positiva y se cuantificó como un islote, para realizar el sumatorio.
- **Área pancreática total:** se escanearon las secciones de tejido pancreático montado en los portas mediante el escáner Nikon Supercoolscan®, las imágenes de los portas fueron guardadas y se analizaron con el software del programa Image J®. Se rodeó manualmente; usando un ratón informático, el área de muestra histológica que correspondía a tejido pancreático y el propio programa haya el valor de dicha área.

Tras la obtención de cada uno de estos parámetros se halló el ratio Número de islotes de células beta pancreática/Área total pancreática y se expresó en mm².

❖ **Área media de los islotes.**

Se empleó un microscopio de fluorescencia (20x) que posee una cámara digital Olympus DP71 (no sé si es la cámara el microscopio) acoplada, para permitir el análisis con el software para tratamiento de imágenes Cell-D®. Se rodeó manualmente, usando un ratón informático, cada una de las áreas insulina positiva y el propio programa haya el valor de cada una de estas áreas. Tras ello se halló el área media de cada una de las muestras analizadas.

❖ **Distribución de las células beta en el interior del islote (homogéneo/heterogéneo).**

Se estableció mediante observación “de visu”, el tipo de distribución predominante que presentan las células beta dentro del islote y sus características:

- **Homogéneo:** Islotes con morfología circular u ovalada, con tinción uniforme para insulina, ausentes de indigitaciones y sin presentar en su interior espacios sin teñir o signos de tejido fibroso. Cuyas células presenten una morfología poliédrica, el núcleo en posición central y una distribución regular del citoplasma.
- **Heterogéneo:** Islotes que presenten cualquiera de las siguientes características o varias de ellas: morfología irregular, tinción para insulina no uniforme, indigitaciones, que posean espacios sin teñir, vacuolas o tejido fibroso en su interior; células que presenten una morfología no poliédrica, el núcleo en posición no central o una distribución regular del citoplasma [3].

4. G. Estrategia de análisis estadístico.

Los resultados se han expresado como la media +/- error estándar de la media (EEM) de los valores obtenidos. El análisis estadístico se ha realizado utilizando el test no paramétrico “U” Mann-Whitney, para el estudio de dos muestras independientes, con el programa informático SPSS versión 21.

Todos los valores en los que la probabilidad de cometer error al rechazar la hipótesis nula (p) resultó menor de 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

5. RESULTADOS.

Estos resultados han sido obtenidos con una muestra final de $n=2$, consistente en 2 ratas macho GK sometidas a la técnica RI50 y 3 ratas macho GK sometidas a la técnica Sham.

5. A. Resultados del estudio de la masa beta pancreática: Área insulina+ (mm^2)/Área sección páncreas (mm^2) x Peso total páncreas (mg)

Las variables que participan de este parámetro, y que es uno de nuestros principales objetos de estudio son:

- Todas las áreas insulina positivas, obtenidas por el marcaje con fluoróforo de los gránulos de insulina, mediante incubación en suero con anticuerpo anti-insulina de cada una de las secciones de páncreas de las ratas diabéticas a las cinco semanas de la cirugía, expresadas en mm^2 .
- El área total de cada una las secciones de páncreas procesadas tras su inclusión en parafina, expresadas en mm^2 .
- El peso total de cada páncreas al mes de la cirugía, expresado en mg.

Este análisis no mostró una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos, aunque la masa beta pancreática del grupo RI50 presenta una tendencia al alza frente al grupo control.

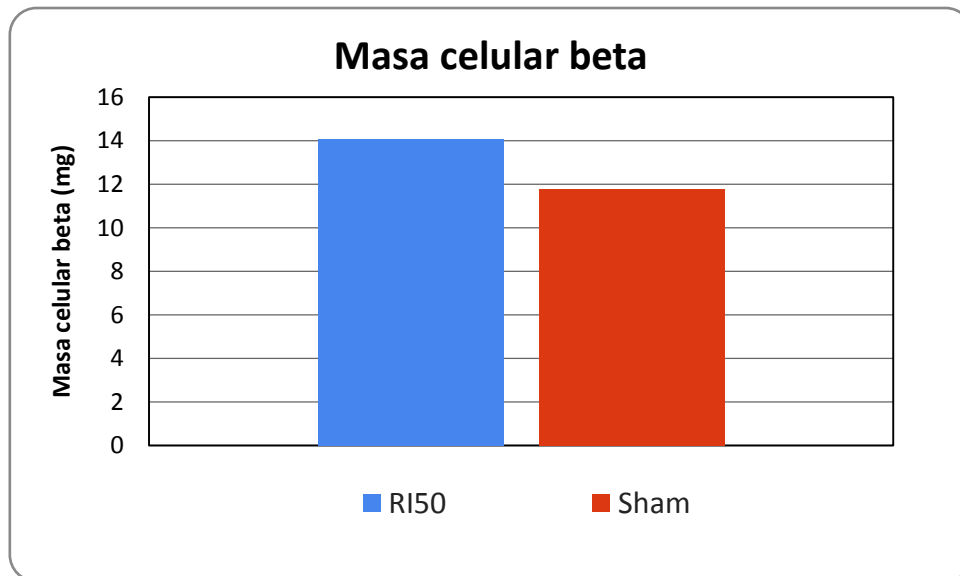


Figura 1: Gráfica que muestra la comparación de la masa celular beta media de los páncreas de los dos grupos, expresadas en miligramos (mg). En el eje de ordenadas se representa la masa celular beta media en miligramos. En el eje de abscisa se indican cada uno de los dos grupos: grupo de resección del cincuenta por ciento del intestino delgado (RI50) y grupo control quirúrgico (Sham). Se observa que el grupo al que se le realizó una resección del cincuenta por ciento del intestino delgado (RI50) presenta una tendencia al alza en su masa celular beta frente al grupo de control quirúrgico (Sham), pero esta diferencia no es estadísticamente significativa.

5. B. Número de islotes / Área total sección páncreas

Este análisis agrupa las siguientes variables:

- El número de islotes de células beta pancreática, encontrados en cada sección de páncreas. Un islote corresponde a un área insulina positiva, obtenida por el marcaje con fluoróforo de los gránulos de insulina, mediante incubación en suero con anticuerpo anti-insulina de cada una de las secciones de páncreas de

las ratas diabéticas a las cinco semanas de la cirugía. Encontrando un número de islotes mínimo de 58 y máximo de 290 por sección de páncreas.

- El área total de cada una de las secciones de páncreas procesadas tras su inclusión en parafina, expresadas en mm².

Este análisis no mostró una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos.

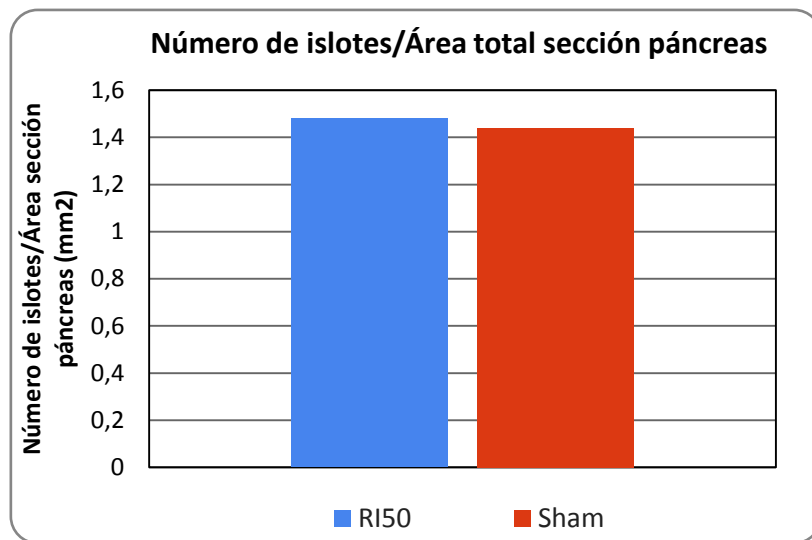


Figura 2: Gráfica que muestra la comparación del número de islotes de célula beta pancreática por área total de la sección del páncreas estudiado, entre los dos grupos, expresadas en mm². En el eje de ordenadas se representa número de islotes de célula beta pancreática por área total de la sección del páncreas expresado en mm². En el eje de abscisa se indican cada uno de los dos grupos: grupo de resección del cincuenta por ciento del intestino delgado (RI50) y grupo control quirúrgico (Sham). Se observa que el grupo al que se le realizó una resección del cincuenta por ciento del intestino delgado (RI50) presenta un discreto aumento en este valor con respecto al grupo de control quirúrgico (Sham), pero esta diferencia no es estadísticamente significativa.

5. C. Área media de los islotes.

Este parámetro analiza las áreas de los islotes de células beta pancreática encontrados en cada sección de páncreas. Correspondiendo un islote a un área insulina positiva, obtenida por el marcaje con fluoróforo de los gránulos de insulina, mediante incubación en suero con anticuerpo anti-insulina de cada una de las secciones de páncreas de las ratas diabéticas al mes de la cirugía.

Este análisis no mostró una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos.

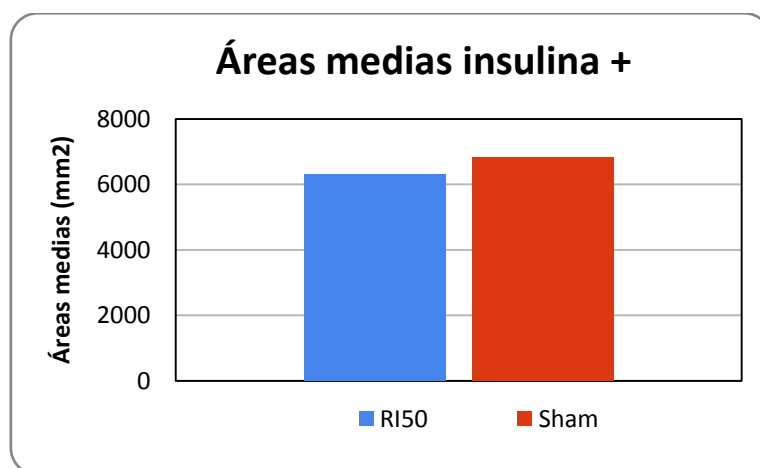


Figura 3: Gráfica que muestra la comparación entre las áreas medias de los islotes de ambos grupos estudiados en micras cuadradas (μm^2). En el eje de ordenadas se representan las áreas medias de los islotes expresados en μm^2 . El eje de abscisa se indican cada uno de los dos grupos: grupo de resección del cincuenta por ciento del intestino delgado (RI50) y grupo control quirúrgico (Sham). Se observa que el grupo al que se le realizó una resección del cincuenta por ciento del intestino delgado (RI50) presenta un discreto descenso de este valor con respecto al grupo de control quirúrgico (Sham), pero esta diferencia no es estadísticamente significativa.

5. D. Resultados de la distribución de las células beta en el interior del islote.

Descripción de la homogeneidad/heterogeneidad histológica.

En la observación *de visu* de las diferentes secciones de páncreas sometidas al marcaje con fluoróforo de los gránulos de insulina, mediante incubación en suero con anticuerpo anti-insulina, a las cinco semanas de la cirugía. No se encontraron diferencias en la distribución de las células beta en el interior del islote entre los dos grupos. Predominando en ambos grupos los islotes heterogéneos con gran irregularidad en la distribución de sus células, así como en la morfología y tinción de las mismas. También se observó la presencia de signos de fibrosis en el interior de los islotes. Dicha heterogeneidad era más marcada cuanto mayor era el tamaño del islote. Sólo algunos islotes pequeños presentaban una morfología homogénea.

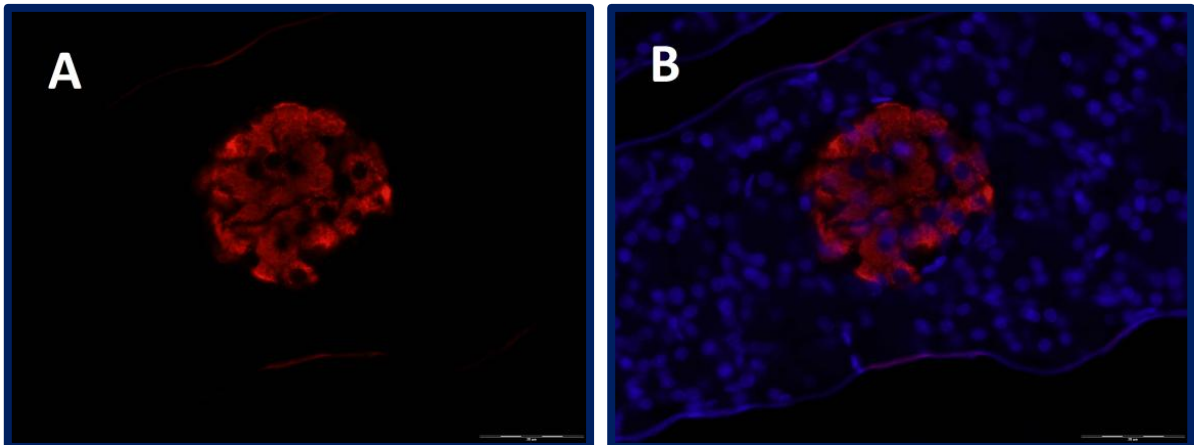


Imagen 5: Células beta marcadas en rojo mediante técnica inmunohistoquímica anti-insulina revelados con fluoróforo (Alexa 546). Núcleos marcados en azul con 4'-6'Diamino fenil-indol (DAPI). Secuencia que representa la observación de un islote que corresponde a la categoría de homogéneo a un aumento de 40X. 6. A: Marcaje anti-insulina que nos permite la observación de un islote central homogéneo, el cual presenta una morfología circular, ausente de digitaciones, no presenta en su interior

áreas sin teñir o signos de tejido fibroso. 6. B Montaje de la foto anterior, junto con su correspondiente para núcleos que nos permite una observación de las células beta que presentan una morfología poliédrica, el núcleo en posición central y una distribución regular del citoplasma.

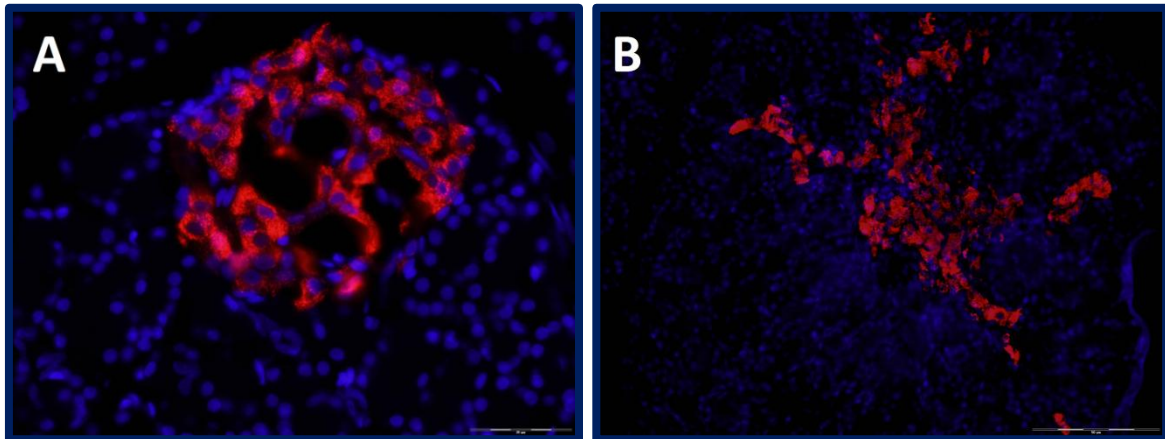


Imagen 6: Células beta marcadas en rojo mediante técnica inmunohistoquímica anti-insulina revelados con fluoróforo (Alexa 546). Núcleos marcados en azul con 4'-6'Diamino fenil-indol (DAPI). Secuencia que representa la observación de dos islotes que corresponde a la categoría de heterogéneo. 7. A: Foto 40X, se observa un islote central que presenta una morfología circular, pero irregular, con una distribución irregular células beta en su interior, con amplias zonas sin teñir. Las células beta presentan también una morfología heterogénea. 7. B: Foto 20X. Se observa un islote central con morfología heterogénea y signos de fibrosis, que pueden corresponder con áreas de desestructuración del islote por crecimiento del tejido conectivo.

6. DISCUSIÓN.

Los efectos positivos de la cirugía bariátrica (CB) sobre la evolución clínica de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) están ampliamente corroborados por múltiples estudios. Hay diversas hipótesis que explican los cambios que subyacen a esta mejoría. Las principales hipótesis cuentan con la exclusión del duodeno como uno de los principales inductores de los cambios que provocan una homeostasis de la glucosa más efectiva [24, 25].

Nosotros proponemos una técnica quirúrgica experimental en la cual se respeta el duodeno, la cual consiste en la resección del cincuenta por ciento del intestino delgado (RI50) aplicada sobre yeyuno e íleon, preservando la zona proximal del primero y la distal del segundo [21]. Dicha cirugía se aplicó a ratas diabéticas (GK), como continuación de los estudios que ya ha realizado este grupo de investigación, pendientes de publicar, en ratas sanas en los que se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en el grupo intervenido mediante RI50 frente al grupo control, a los tres meses tras la intervención [20].

En este nuevo estudio nos hemos centrado en la observación de las modificaciones histológicas del páncreas de animales diabéticos tras cinco semanas de la cirugía RI50, concretamente hemos analizado la masa celular beta pancreática y la histomorfometría de sus islotes.

La modificación en la masa celular beta tras la CB es la expresión de los cambios que se producen en el páncreas endocrino. Cambios necesarios en el islote pancreático para adaptarse a nuevas condiciones y poder así alcanzar un nuevo equilibrio. Estos últimos deben ser lo suficientemente potentes y mantenidos en el tiempo para que se traduzcan en una modificación de la masa celular beta.

Si atendemos a la definición de masa beta es necesario la observación multifactorial del área de los islotes, del área de la sección de tejido pancreático y del peso del páncreas para su estudio. Todo esto constituye un apartado especialmente interesante del presente trabajo, al permitirnos dicho parámetro una medida indirecta de los procesos de recambio celular. Ya que, la masa de células beta en ratas depende, al igual que en el humano del ratio proliferación/apoptosis/neogénesis. [26]

En la bibliografía consultada, sólo hemos encontrado un trabajo que ya haya usado este parámetro para el estudio de las modificaciones de la CB en el páncreas endocrino, pero la cirugía realizada ha sido de tipo mixto y aplicada en cerdos [18].

Además, el método que hemos aplicado para el estudio del área de los islotes, permiten una gran potencia estadística en comparación con las técnicas comúnmente usadas para la medida de este factor. Esto se debe a que, las técnicas inmunohistoquímicas de marcaje con fluoróforo proporcionan una mayor precisión en la medida de las áreas y permiten estudiar islotes de áreas inferiores a las que permiten las otras técnicas [19].

Nuestros resultados en el análisis de la masa celular beta muestran una cierta tendencia al incremento no estadísticamente significativo en el grupo del RI50, a las cinco semanas de la realización de la cirugía, respecto a los grupos controles (Figura 1). Estos resultados están en la línea de los obtenidos por este grupo de investigación en ratas sanas, en las que la masa celular beta se mostró aumentada significativamente en el grupo del RI50, a los tres meses de la realización de la cirugía, respecto a los grupos controles y los grupos intervenidos mediante otras técnicas de CB [20].

Salvando las distancias metodológicas, nuestros datos se ven hasta cierto punto corroborados por trabajos previos tales como el realizado en cerdos en los cuales no se

tiene en cuenta el peso del páncreas para el estudio de la masa celular beta. En estos, a las dos semanas tras CB con componente malabsortivo si existe aumento de la masa beta con diferencias significativas [18].

La ausencia de diferencias significativas en nuestros resultados de la masa celular beta de los páncreas del grupo de animales sometidos a RI50 y sus controles, puede ser debido a la baja potencia estadística del estudio, debido a la escasa muestra final conseguida para análisis (n=2). O a la necesidad de un periodo de supervivencia más prolongado tras la cirugía, que permita traducir los cambios fisiológicos acaecidos en el islote, en un incremento de la masa celular beta. Si bien no muestra diferencias significativas, marca ciertas tendencias, que podrían suponer la necesidad de prolongar el tiempo de estudio para obtener resultados más potentes como los observados en las ratas Wistar a las doce semanas tras la cirugía.

Por su parte, el estudio de la histomorfometría de los islotes pancreáticos permite establecer qué mecanismos celulares están influyendo de forma mayoritaria en las modificaciones producidas en la masa celular beta pancreática.

Los mecanismos de proliferación a partir de células beta pre-existentes provocan un aumento homogéneo del área de los islotes, pero no del número de islotes. Sin embargo, el incremento en el número de islotes, especialmente cuando poseen tamaños reducidos, orientan hacia procesos de neogénesis a partir de células madre o células epiteliales localizadas en los ductos pancreáticos. La apoptosis, por su parte, implicaría una reducción en el área de los islotes [27,28].

Dentro del estudio histomorfométrico valoramos el área media de los islotes. En el grupo sometido a RI50, esta área tiende a estar disminuida con respecto al grupo control, pero no aparecen diferencias significativas (Figura 3). Por lo que no se puede

establecer que la proliferación, por si sola, sea el mecanismo que predomine en la tendencia al incremento que muestra la masa celular beta, ni descartar que la apoptosis se encuentre aumentada.

Otro parámetro estudiado, el número absoluto de islotes, no varía en ninguno de los grupos, siendo este dato incluso más homogéneo que el área media (Figura 2). Por lo que los procesos de neogénesis pueden estar influyendo en la tendencia mostrada por la masa celular beta pancreática.

Nuestros hallazgos se ven corroborados por lo poco que hemos encontrado en la literatura al respecto. Así en ratas GK, aunque en modelo restrictivo (Gastrectomía vertical), el área media de los islotes fueron similares al control, sin diferencias a las 13 semanas de la intervención [29].

Otro estudio, en ratas sanas, aunque en modelo malabsortivo (derivación yeyunoileal), donde excluyen el 95% del intestino delgado del paso de nutrientes, describen la ausencia de cambios a nivel de los islotes pancreáticos, así como tampoco varían ni el área ni el tamaño. Todo esto ocurre a las cinco semanas de la cirugía [30].

No obstante esto podría no ser así en humanos, ya que en otro modelo animal (cerdos castrados), tras dos semanas de supervivencia a la cirugía tras Bay-pass Gástrico (BG), se obtiene un aumento del número de islotes significativo y una tendencia a que el tamaño de los mismos sea mayor [18].

Esto último coincide con los resultados en humanos, al observar tras BG un aumento del número y tamaño de los islotes [31].

En la descripción *de visu* de la distribución de las células beta dentro del islote pancreático tampoco hemos encontrado diferencias entre el grupo sometido a R150 y el grupo control (Imágenes 5 y 6). La predominancia en ambos grupo de islotes

heterogéneos corresponde con lo ya descrito por Movassat et al. en 1997 sobre la evolución de la morfología de los islotes pancreáticos de las ratas GK con la edad y la descripción de islotes en forma de estrellas de mar, también observados en los páncreas de nuestros animales [19].

La ausencia de diferencias en nuestros resultados puede deberse a la escasa muestra final obtenida para este estudio ($n=2$), aunque también puede estar influida por el estudio temprano tras la cirugía y nos esté indicando que es preciso un mayor periodo de supervivencia tras la intervención para que se produzcan las señales alteradas por la cirugía provoquen modificaciones en la histomorfometría de los islotes.

En relación a todo lo expuesto, creemos que con una n muestral más elevada quizás hubiésemos obtenido resultados más firmes en aquellos en los que sólo hemos observado tendencias. El tiempo limitado y las dificultades técnicas nos han obligado a acotar nuestro estudio a lo ya reflejado.

Tampoco podemos olvidar que los cambios que se produzcan en el páncreas endocrino para conseguir la homeostasis de la glucosa, depende de un equilibrio entre diversos factores entre los que además de las señales provenientes del tubo digestivo, se encuentran también señales provenientes del tejido periférico y el sistema nervioso. Estando todas ellas interrelacionadas y conectadas. Los resultados mostrados son sólo parciales y centrados en algunos aspectos del páncreas. Sería preciso el estudio funcional e histológico de todos los factores implicados para entender los mecanismos de reversión de la DM2 en animales de experimentación y humanos.

En conclusión, nuestros resultados muestran la idoneidad de los métodos utilizados por este equipo para el estudio de las modificaciones histológicas

acontecidas en el páncreas de ratas diabéticas, tras cinco semanas de la cirugía malabsortiva experimental tipo RI50, en lo referente al análisis de la masa celular beta e histomorfometría de los islotes pancreáticos. Pero no podemos establecer conclusiones firmes sobre el tipo de cambio acontecido o los procesos celulares a los que son debidos por la baja potencia estadística de nuestra muestra final (n=2). Por lo que no podemos confirmar nuestra hipótesis: La intervención quirúrgica mediante cirugía bariátrica malabsortiva tipo RI50 en ratas diabéticas tipo GK, provocará cambios en la masa celular beta pancreática de dichos animales.

Aunque si se vislumbran tendencias, que coinciden con la bibliografía consultada y los resultados que este grupo de investigación posee. Estas indican un incremento de la masa celular beta en los animales sometidos a RI50, respaldando la hipótesis del intestino medio (teoría del Middlegut) como responsable de la expresión de este fenómeno, frente a las hipótesis que centran su atención en las porciones proximales (Foregut) y/o distales (Hindgut), y resalta la importancia del segmento yeyunal como responsable de modificaciones en el eje entero-insular.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.** OMS: Organización Mundial de la Salud [Internet]. Ginebra: OMS; 2014 [citado 10 may 2015] Diabetes. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>
- 2.** González P, Faure E, del Castillo A. Coste de la diabetes mellitus en España. *Med Clin.* 2006;127(20): 776-784.
- 3.** Friedman MN, Sancetta AJ, Magovern G.J. The amelioration of diabetes mellitus following subtotal gastrectomy. *Surg Gynecol Obstet*, 1955;100(2): 201-204.
- 4.** OMS: Organización Mundial de la Salud [Internet]. Ginebra: OMS; 2014 [citado 10 may 2014] Obesidad. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- 5.** Brenizer AG, Extensive resections of the small intestine. *Ann Surg* 1929 May;89(5): 675-679.
- 6.** Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2004 Oct 13;292(14):1724-1737.
- 7.** Vanderhoof JA¹, Langnas AN. Short-bowel syndrome in children and adults. *Gastroenterology* 1997 Nov;113(5):1767-78.
- 8.** 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 Mar;122(3):248-256.
- 9.** Rubioa MA, Monereo S, Lecubea A, Resab J, Masdevallb C, et al. Posicionamiento de las sociedades SEEN-SECO-SEEDO-SED sobre la cirugía metabólica en la diabetes mellitas tipo-2. *Endocrinol Nutr* 2013 ;60(10):547-548.

- 10.** Cummings DE, Shannon MH. Ghrelin and gastric bypass: is there a hormonal contribution to surgical weight loss? *J Clin Endocrinol Metab* 2003 Jul;88(7): 2999-3002.
- 11.** 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 Jan;239(1):1-11.
- 12.** Bose M, Oliván B, Teixeira J, Pi-Sunyer FX, Laferrère B. Do incretins play a role in the remission of Type 2 Diabetes after gastric bypass surgery: what are the evidence? *Obes Surg* 2009 Feb;19(2):217-229.
- 13.** Henquin JC, Cerasi E, Efendic S, Steiner DF, Boitard C. Pancreatic beta-cell mass or beta-cell function? That is the question! *Diabetes Obes Metab*. 2008 Nov;10 Suppl 4:1-4.
- 14.** Movassat J, Calderari S, Fernández E, Martín MA, Escrivá F, Plachot C, Gangnerau MN, Serradas P, Alvarez C, Portha B. Type 2 diabetes - a matter of failing beta-cell neogenesis? Clues from the GK rat model. *Diabetes Obes Metab*. 2007 Nov;9 Suppl 2:187-95.
- 15.** Hanley SC, Austin E, Assouline-Thomas B, Kapeluto J, Blachman J, Moosavi M, Petropavlovskaja M, Rosenberg L. β -Cell mass dynamics and islet cell plasticity in human type 2 diabetes. *Endocrinology*. 2010 Apr;151(4):1462-72.
- 16.** Cho JH, Kim JW, Shin JA, Shin J, Yoon KH. β -cell mass in people with type 2 diabetes. *J Diabetes Investig*. 2011 Jan 24;2(1):6-17.
- 17.** Li Z, Zhang HY, Lv LX, Li DF, Dai JX, Sha O, Li WQ, Bai Y, Yuan L. Roux-en-Y gastric bypass promotes expression of PDX-1 and regeneration of beta-cells in Goto-Kakizaki rats. *World J Gastroenterol*. 2010 May 14;16(18):2244-51.

- 18.** Lindqvist A, Spégel P, Ekelund M, Garcia Vaz E, Pierzynowski S, Gomez MF, et al. Gastric bypass improves β -cell function and increases β -cell mass in a porcine model. *Diabetes* 2014 May;63(5):1665-71.
- 19.** Movassat J, Saulnier C, Serradas P, Portha B. Impaired development of pancreatic beta-cell mass is a primary event during the progression to diabetes in the GK rat. *Diabetologia*. 1997 Aug;40(8):916-25.
- 20.** Alonso Camacho R. Modelos de cirugía bariátrica en rata Wistar normopesa y no diabética. Cambios histológicos a nivel pancreático y en la homeostasis de la glucosa. [Tesis doctoral]. Cádiz: Dpto de Anatomía y Embriología humanas, Universidad de Cádiz; 2015.
- 21.** Collantes Pérez J, Prada Oliveira JA, Gómez Luy C, Vallo De Castro JJ, Verástegui Escolano C. A useful experimental model of short bowel syndrome. *J Invest Surg* 2004 Jan-Feb;17(1):9-14.
- 22.** Arias-Díaz J1, Balibrea J. Animal models in glucose intolerance and type-2 diabetes. *Nutr Hosp*. 2007 Mar-Apr;22(2):160-8.
- 23.** Guenifi A1, Abdel-Halim SM, Höög A, Falkmer S, Ostenson CG. Preserved beta-cell density in the endocrine pancreas of young, spontaneously diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Pancreas*. 1995 Mar;10(2):148-53.
- 24.** Lautz D, Halperin F, Goebel-Fabbri A, Goldfine AB. The great debate: medicine or surgery: what is best for the patient with type 2 diabetes? *Diabetes Care*. 2011 Mar;34(3):763-70. doi: 10.2337/dc10-1859.
- 25.** Schauer PR, Bhatt DL, Kirwan JP, Wolski K, Brethauer SA, Navaneethan SD, et al. Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes--3-year outcomes. *N Engl J Med*. 2014 May 22;370(21):2002-13.

- 26.** Turrel C, Bailbe D, Lacorne M, Meile MJ, Kergoat M, Portha B. Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes*. 2002 May;51(5):1443-52.
- 27.** Yesil P, Lammert E. Islet dynamics: a glimpse at beta cell proliferation. *Histol Histopathol*. 2008 Jul;23(7):883-95.
- 28.** Bonner-Weir S, Li WC, Ouziel-Yahalom L, Guo L, Weir GC, Sharma A. Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story. *Diabetes*. 2010 Oct;59(10):2340-8.
- 29.** Inabnet WB, Milone L, Harris P, Durak E, Freeby MJ, Ahmed L, et al. The utility of [(11)C] dihydrotetrabenazine positron emission tomography scanning in assessing beta-cell performance after sleeve gastrectomy and duodenal-jejunal bypass. *Surgery*. 2010 Feb;147(2):303-9.
- 30.** Pederson RA, Buchan AM, Zahedi-Asl S, Chan CB, Brown JC. Effect of jejunoileal bypass in the rat on the enteroinsular axis. *Regul Pept*. 1982 Dec;5(1):53-63.
- 31.** Reubi JC, Perren A, Rehmann R, Waser B, Christ E, Callery M. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors are not overexpressed in pancreatic islets from patients with severe hyperinsulinaemic hypoglycaemia following gastric bypass. *Diabetologia*. 2010 Dec;53(12):2641-5.