ISSN 0025-7680

ARTICULO ORIGINAL

MEDICINA (Buenos Aires) 1996; 56: 666-670

ESTRUCTURA Y ULTRAESTRUCTURA DEL PANCREAS ENDOCRINO DE RATONES TRANSGENICOS DIABETICOS

FELIX J. CORRONS[1], GISELA A. CAMIHORT[1], CESAR L. A. GOMEZ DUMM[1], PAUL N. EPSTEIN[2], JUAN J. GAGLIARDINO[1]

[1] *CENEXA, Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata;* [2] *Department of Pharmacology and Toxicology, University of North Dakota, USA*

Resumen El objetivo del trabajo fue corroborar los cambios estructurales y determinar las alteraciones ultraestructurales ocurridas en el páncreas endocrino de ratones con un síndrome inducido de diabetes mellitus insulinodependiente (DMID). Para ello se utilizaron ratones transgénicos (OVE 27) que sobreexpresan el gen de calmodulina en las células β del páncreas endocrino; en estos animales, el aumento de calmodulina disminuye los niveles de calcio citosólico de las células β, produciendo alteraciones morfológicas y funcionales que desencadenan una DMID de curso severo. Para nuestro estudio se obtuvieron y procesaron porciones del páncreas (cola) de 4 ratones transgénicos machos diabéticos de 5 semanas de edad (glucemia: 376 ± 2 mg/dl) y de 4 controles no transgénicos de la misma cepa, sexo y edad (glucemia: 113 ± 13 mg/dl). El estudio inmunohistoquímico con microscopía de luz confirmó que los ratones transgénicos presentan una disminución del número y tamaño de los islotes con distorsión de su arquitectura, sin respuesta inflamatoria asociada. Los estudios ultraestructurales demostraron diversos grados de daño en las células β, tales como la presencia de interdigitaciones de membrana y alteraciones de sus organelas y de sus gránulos de secreción. Estos hallazgos coinciden con el deterioro cuantitativo y funcional de las células β y la conservación de las poblaciones celulares no-β de los islotes. Estos cambios ultraestructurales en las células β del páncreas del modelo experimental estudiado, sumados a las alteraciones inmunohistoquímicas previamente descriptas, contribuyen a explicar la manifestación de la diabetes.

Palabras clave: diabetes experimental, islote pancreático, ratón transgénico, inmunohistoquímica, ultraestructura de células β.

La patogenia de la diabetes mellitus insulinodependiente (DMID) se ha estudiado utilizando diversos modelos animales. Uno de los métodos más simples y frecuentes de producción del síndrome diabético ha sido la administración de drogas como el aloxano y la estreptozotocina, que alteran en forma más o menos selectiva las células beta (β) insulares.

En 1989, Epstein y col.[1] produjeron ratones transgénicos portadores de un gen que expresaba exceso de calmodulina y de su ARNm en las células β del páncreas endocrino. La calmodulina es un mediador intracelular del calcio para la regulación de diversas funciones, tales como la regulación de la secreción de insulina. La producción excesiva de calmodulina en las células β produjo una alteración en la función y viabilidad de estas células, con la subsiguiente aparición de una severa DMID[1, 2].

En un trabajo previo[3] describimos los cambios producidos en las poblaciones celulares del páncreas endocrino de estos ratones transgénicos diabéticos, utilizando la inmunohistoquímica cuantitativa con microscopía de luz. En el presente estudio, el objetivo fue confirmar las lesiones in-

Recibido: 5-IX-1995 Aceptado: 3-VII-1996

Dirección postal: Dr. Juan José Gagliardino, Cenexa, Facultad de Ciencias Médicas UNLP, Calles 60 y 120, 1900 La Plata, Argentina

sulares propias de estos animales y analizar, por primera vez, la ultraestructura de su páncreas endocrino, especialmente referida a las células β.

Materiales y métodos

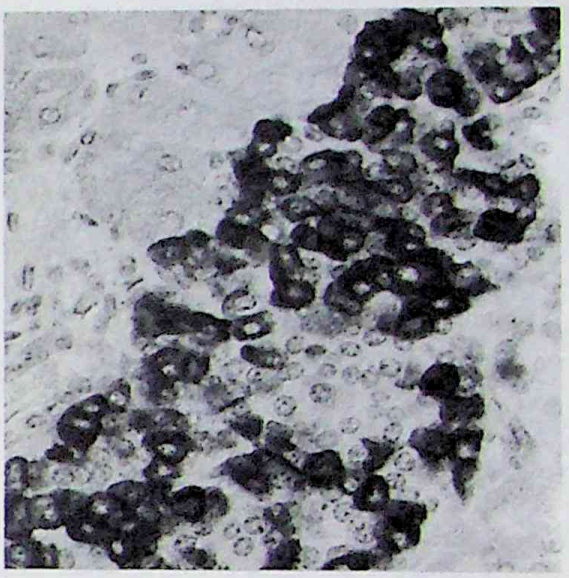
Se utilizaron ratones transgénicos diabéticos obtenidos mediante el procedimiento descripto originalmente por Epstein y col.[1]. En el experimento se emplearon 4 ratones machos OVE 27 de 5 semanas de edad, con diabetes comprobada mediante dosaje de glucosa en sangre (Hemoglucotest 20-800, Boehringer Mannheim): 376 ± 2 mg/dl. Como control se utilizaron 4 animales no transgénicos de la misma cepa, sexo y edad cuyas glucemias fueron: 113 ± 13 mg/dl. Los ratones se sacrificaron por luxación cervical y se extrajo la cola del páncreas, que se procesó mediante técnicas de microscopías de luz y electrónica. Para las primeras, el material se fijó en líquido de Bouin y se incluyó en parafina. Los cortes seriados obtenidos (5 µm) se procesaron según la técnica de la peroxidasa[4] para la detección inmunohistoquímica de insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático (células β, α, δ y PP, respectivamente). Para ello, se empleó suero policlonal de cobayo anti-insulina producido en nuestro laboratorio, así como suero policlonal de conejo anti-glucagón (Dr. Lise Heding, Novo Nordisk), anti-somatostatina (Dr. Suad Efendic, Karolinska Institute) y anti-polipéptido pancreático (Dr. Ronald Chance, Eli Lily). El control de la especificidad de los antisueros se obtuvo preabsorbiendo cada uno de ellos con exceso de su respectivo antígeno[3]. Como coloración nuclear se utilizó la hematoxilina.

Para microscopía electrónica, el material se fijó en glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato, se postfijó en tetróxido de osmio al 1% y se incluyó en araldita. Previa observación de cortes finos coloreados con azul de toluidina para la detección de islotes, se efectuaron cortes ultrafinos que se tiñeron con uranio-plomo y se estudiaron mediante un microscopio electrónico JEM 1200 EX del Servicio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP).

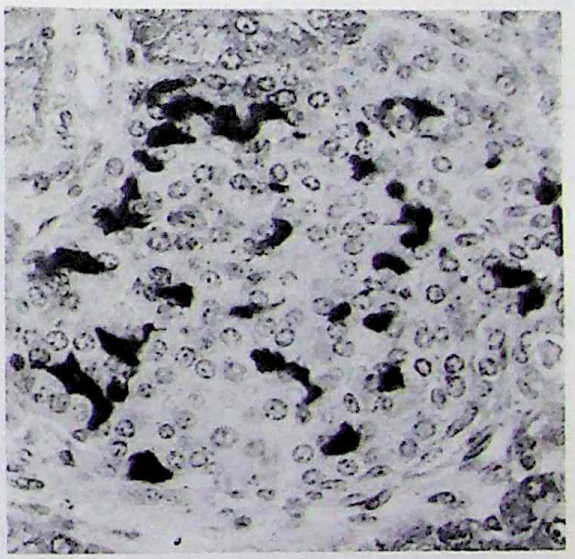
Resultados

En los preparados de inmunohistoquímica, los islotes provenientes de los animales control mostraron un aspecto general normal y la característica distribución central de las células β y periférica de las no-β. En cambio, en el páncreas endocrino de todos los ratones diabéticos se confirmaron los hallazgos descriptos previamente en ratones bajo las mismas condiciones experimentales: disminución significativa del número y tamaño de los islotes; un 20% de esos islotes presentaron distorsión en su arquitectura, mostrando células β menos numerosas y sin su característica disposición central compacta. (Fig. 1 A); en muchos islotes las células no-β exhibieron una distribución irregular (Fig. 1 B), en contraste con la casi constante ubicación periférica que se aprecia normalmente.

Con respecto a los estudios ultraestructurales, la detección de islotes en los animales transgé-



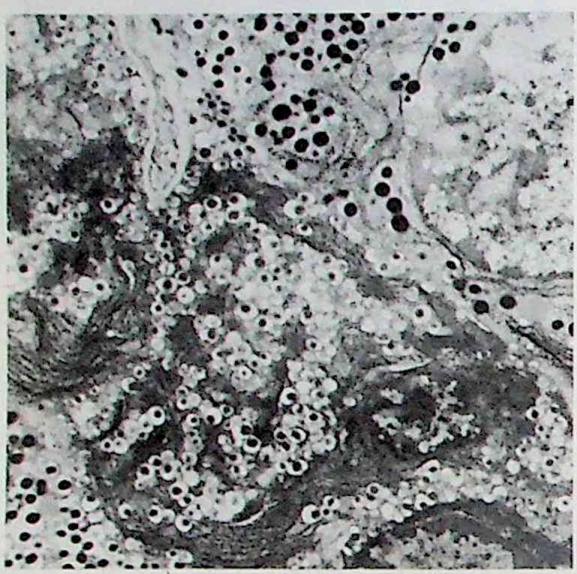
A



B

Fig. 1.— Inmunohistoquímica aplicada a islotes pancreáticos de un animal diabético. *A:* suero anti-insulina; *B:* suero anti-glucagón. X 40

nicos resultó dificultosa debido a la reducción ya descripta de su número y tamaño. Nuestras observaciones se centraron especialmente en las células β, que fueron las únicas afectadas en estos animales en una proporción variable. Las mismas mostraron una densidad electrónica heterogénea, con zonas más densas que correspondían en parte al retículo endoplásmico rugoso (Fig. 2 A). En algunos campos se visualizaron espacios intercelulares con gran cantidad de interdigitaciones de límites muy bien demarcados (Fig. 2 B) que no se observaron en los animales control.



A

B

Fig. 2.— Microscopía electrónica de células β de animales diabéticos. *A:* X 6.500; *B:* X 14.000.

Los granos de secreción de las células β exhibieron su aspecto característico (Fig. 3 A), presentando un amplio halo claro rodeado por su membrana envolvente, con el grano propiamente dicho en posición central o algo excéntrico. En numerosas células β se encontró una elevada proporción de granos de mediana o baja densidad electrónica.

Las mitocondrias presentaron frecuentemente alteraciones de intensidad variable. Las más afectadas mostraron borramiento parcial de la membrana externa y de las crestas, así como figuras mielínicas en contacto o dentro de mitocondrias distorsionadas (Fig. 3 B). En algunas zonas (Fig. 3 C) aparecieron membranas lisas múltiples y paralelas, agrupadas en franjas que separaban áreas del citoplasma en las cuales se observó retículo endoplásmico rugoso en forma de vacuolas claras con escasos ribosomas.

En algunos campos se comprobó la presencia de posibles cuerpos apoptósicos (Fig. 3 D) conteniendo granos de secreción, retículo endoplásmico rugoso y otras organelas con estructura conservada, a veces rodeados por restos celulares muy alterados.

Las células no-β de los animales diabéticos (células α en Fig. 2 A) no mostraron cambios con respecto a los controles.

Discusión

El síndrome diabético experimental estudiado en el presente trabajo representa un modelo promisorio y relativamente nuevo para el conocimiento de diferentes aspectos morfológicos y funcionales de la DMID.

Desde el punto de vista de la microscopía de luz del páncreas endocrino, nuestras observaciones confirman los hallazgos preliminares de Epstein y col.[1], ampliados luego con datos morfométricos por nuestro grupo de trabajo[3] y que explican la manifestación del síndrome diabético en estos animales.

Los cambios ultraestructurales observados representan la primera descripción de alteraciones de las células β en el páncreas de ratones transgénicos diabéticos. La presencia de un gran número de granos de secreción pálidos se ha observado en otros síndromes diabéticos experimentales severos[5, 7-9]; su presencia se considera

consecutiva a una disminución del tiempo de almacenamiento, que conduce a la liberación de material secretorio inmaduro ante la demanda exagerada de insulina[5, 8].

La mayor frecuencia de lisosomas[5, 7, 9], a veces como figuras mielínicas[6] semejantes a los descriptos en nuestro modelo, también se ha observado en las células β de animales diabéticos. También se han descripto alteraciones en el número, tamaño y aspecto de las mitocondrias de las células β, similares a las observadas en nuestro modelo[5, 6]. No tenemos explicación clara con respecto a la presencia de los grupos de membranas paralelas y de las interdigitaciones.

En definitiva, nuestros resultados demuestran cambios ultraestructurales a nivel de las células β del páncreas de los ratones transgénicos diabéticos. Estas alteraciones, que solamente afectaron al mencionado tipo celular, sumadas a las características previamente descriptas mediante estudios de inmunohistoquímica con microscopía de luz, explican la manifestación del síndrome diabético en ratones transgénicos que sobreexpresan el gen de calmodulina.

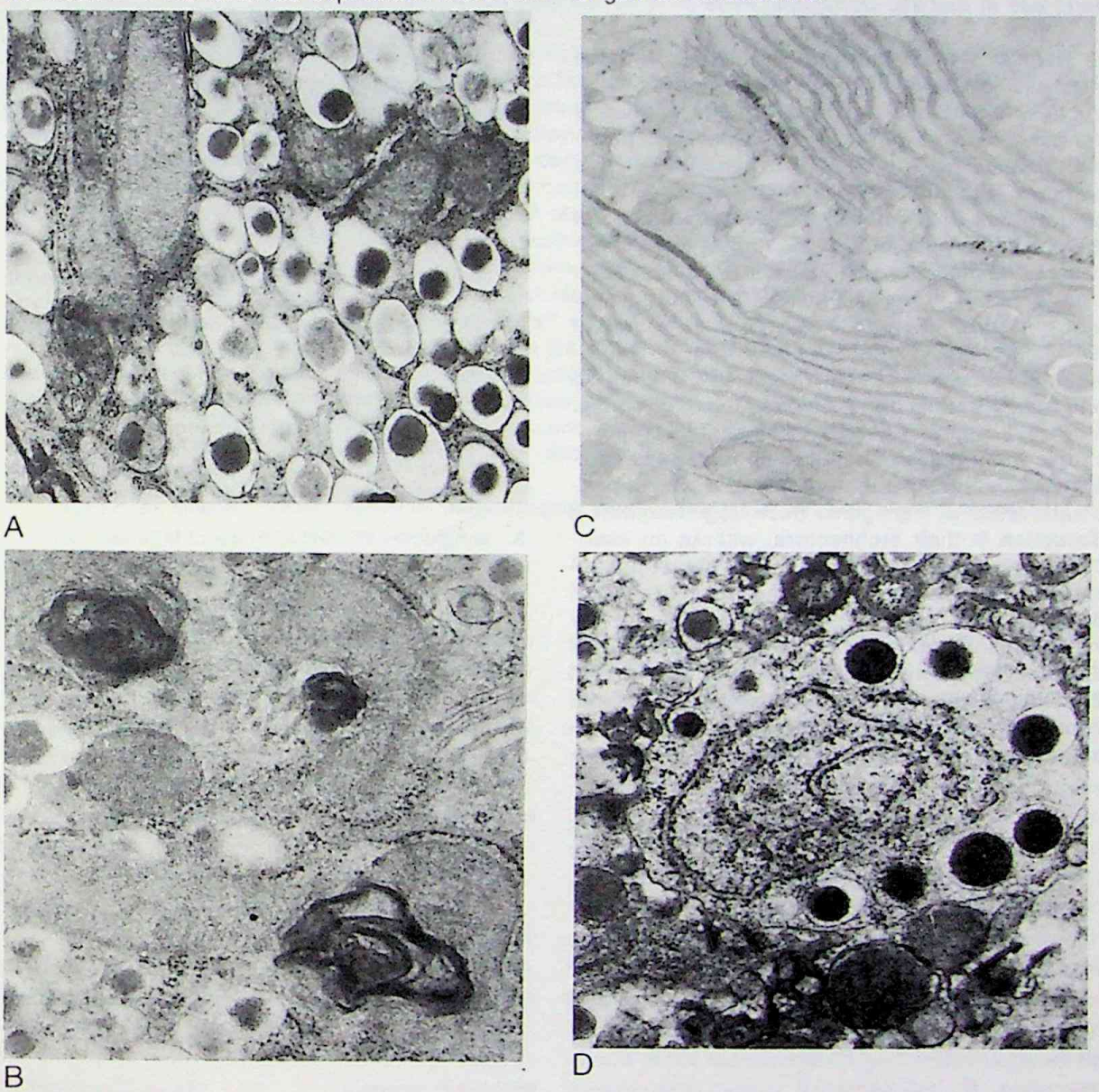


Fig. 3.— Microscopía electrónica de células β de animales diabéticos. *A:* X 18.000; *B:* X 19.000; *C:* X 20.500; *D:* X 19.000.

Agradecimientos. El presente trabajo fue parcialmente financiado por el CONICET. Los autores agradecen la asistencia técnica de la Dra. S. Jurado y del Dr. M. Petruccelli del Depto. de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, y de G. Luna y C. Bianchi. Igualmente agradecen a la Srta. Lidia A. Di Maggio por la tarea de secretaría realizada.

Summary

Structure and ultrastructure of the endocrine pancreas in diabetic transgenic mice

The aim of the present study was to confirm the structural changes and to establish the ultrastructural alterations that occur in the endocrine pancreas of mice with an induced insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) syndrome. For that purpose, we used transgenic mice (OVE 27) that overexpress a calmodulin gene in the β cells of the endocrine pancreas. In these animals, the excess of calmodulin decreases the cytosolic calcium levels in β cells, leading to morphological and functional alterations that produce a severe IDDM. Sections of pancreas (tail) from 4 male 5-week-old diabetic mice (glycemia: 376 ± 2 mg/dl) and from 4 normal age-matched males (glycemia: 113 ± 13 mg/dl) were processed. Light microscopic immunohistochemical observations confirmed a decrease in the number and size of pancreatic islets in transgenic mice, together with a disruption in their architecture, without an associated inflammatory response. The ultrastructural studies revealed diverse degrees of injury in the β cells, such as the presence of membrane interdigitations and alterations in their organelles and secretory granules. These findings are in agreement with the quantitative and functional impairment of β cells, coexisting with a normal appearance of non-β cell populations within the pancreatic islets. Our results demonstrate the existence of ultrastructural changes in the pancreatic β cells of the experimental model studied. Such changes, together with the immunohistochemical alterations previously described, contribute to explain the appearance of a diabetic syndrome in these animals.

Bibliografía

1. Epstein PN, Overbeek PA, Means AR. Calmodulin-induced early-onset diabetes in transgenic mice. *Cell* 1989: 58: 1067-73.
2. Shizuru JA, Sarvetnick N. Transgenic mice for the study of diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* 1991: 2: 97-104.
3. Gómez Dumm CLA, Atwater I, Epstein PN, Gagliardino JJ. Quantitative immunocytochemical study of islet cell populations in diabetic calmodulin-transgenic mice. *Virchows Arch* 1994: 425: 73-7.
4. Sternberger LA, Handy PH, Cuculis JJ, Meyer HC. an unlabelled antibody method of immuno-cyto-chemistry. *J Histochem Cytochem* 1970: 18: 315-40.
5. Gruber HE, Schedl HP, Osborne JW. Alteration in islet cell ultrastructure following streptozotocin induced diabetes in the rat. *Acta diabet Lat* 1980: 17: 213-23.
6. Like AA, Chick WL. Studies in the diabetic rat and mouse: II Electron microscopy of pancreatic islets. *Diabetologia* 1970: 6: 216-42.
7. Munger BL, Lang CM. Spontaneous diabetes mellitus in guinea-pigs. The acute cytopathology of the islets of Langerhans. *Lab Invest* 1973: 29: 685-702.
8. Stauffacher W, Orci L, Amherdt M, *et al.* Metabolic state, pancreatic insulin content and β-cell morphology of normoglycemic spiny mice (*Acomys cabirinus*): Indications for an impairment of insulin secretion. *Diabetologia* 1970: 6: 330-42.
9. Gómez Dumm CLA, Semino MC, Gagliardino JJ. Quantitative morphological changes in endocrine pancreas of rats with spontaneous diabetes mellitus. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1989: 57: 375-81.