



Universidad de Valladolid

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y
FISIOLOGÍA



TRABAJO FIN DE MÁSTER

“ESTUDIO DE LAS CÉLULAS PANCREÁTICAS PRODUCTORAS DE SOMATOSTATINA EN DIABETES MELLITUS TIPO 2”

PRESENTADO POR:

SILVIA HERNÁNDEZ DE LA RED

DIRIGIDO POR:

DRA. IRENE CÓZAR CASTELLANO

DRA. BEATRIZ MERINO ANTOLÍN

Contenido

Abreviaturas.....	3
Abstract.....	4
Introducción.....	5
El páncreas endocrino	5
Diabetes Mellitus	7
Materiales y métodos	10
Procedencia, tratamiento y procesado de las muestras.....	10
Inmunodetección de insulina y somatostatina.....	12
Microscopía	14
Cuantificaciones	15
Cálculos, análisis estadístico y representación gráfica.....	15
Resultados	17
a. <i>Estudios en secciones de páncreas humanos</i>	17
b. <i>Estudios en islotes humanos tratados con insulina</i>	20
c. <i>Estudios en secciones de páncreas de ratones</i>	22
Discusión	24
Conclusiones.....	27
Bibliografía	28

Abreviaturas

DM – Diabetes Mellitus

DM1 – Diabetes Mellitus tipo 1

DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2

ADO – Antidiabéticos Orales

SD – Standard Diet (dieta estándar)

HFD – High Fat Diet (dieta alta en grasas)

PBS – Phosphate-Buffered Saline (tampón fosfato salino)

NGS – Normal Goat Serum (suero de cabra normal)

BSA – Bovine Serum Albumin (albúmina sérica bovina)

DAPI – 2-(4-amidinophenyl)-1H -indole-6-carboxamide

FITC – Fluorescein Isothiocyanate

TRITC – Tetramethylrhodamine

ANOVA – análisis de la varianza unidireccional

sst – somatostatina

ins – insulina

M – mujeres

H – hombres

Abstract

The pancreas is an organ with endocrine and exocrine functions. Langerhans islets are sphere-like structures embedded in the pancreas, composed of several types of hormone-producing cells, such as insulin-producing β cells, glucagon-producing α cells and somatostatin-producing δ cells, which are responsible for the pancreatic endocrine function. Pancreatic β cells make up the most cells in the islets and they produce insulin, a hormone that promotes blood glucose transport into its target cells.

Diabetes is a chronic metabolic disease that affects glucose homeostasis. It is considered a global pandemic, with around 463 million diabetic patients, an estimated of 193 million undiagnosed people and approximately five million deaths per year around the world. There are two types of diabetes, and both are characterized by insulin impairment and β cell alterations, which affect glucose homeostasis and result in increased blood glucose (hyperglycemia).

However, β cells are not the only pancreatic endocrine cells affected in diabetes. Several studies have identified alterations in α and δ cells population and function in diabetic patients and animal models, which are thought to be a helping cause for the disease development.

Therefore, we sought to investigate the evolution of δ cell population throughout various stages and treatments of type 2 diabetes, for which we used human islets and human and rodent pancreas samples that we have studied by double immunofluorescent detection of insulin and somatostatin. We found somatostatin-producing δ cell population to be markedly reduced in long-term diabetes as opposed to healthy and prediabetic samples, as well as a significant increase in δ cell size after insulin treatment.

Introducción

El páncreas endocrino

El páncreas es un órgano glandular alargado, de unos 15 centímetros de longitud, que se encuentra situado detrás del estómago y tiene función exocrina y endocrina. El páncreas exocrino produce y vierte al tubo digestivo enzimas implicadas en la digestión de los alimentos, mientras que la función endocrina del páncreas se concentra en los islotes de Langerhans (1). Los islotes son acúmulos de células productoras de diversas hormonas, que dan lugar a estructuras altamente vascularizadas distribuidas por todo el órgano e integradas en el páncreas exocrino, suponiendo sólo el 2% del total del órgano (fig. 1) (2).

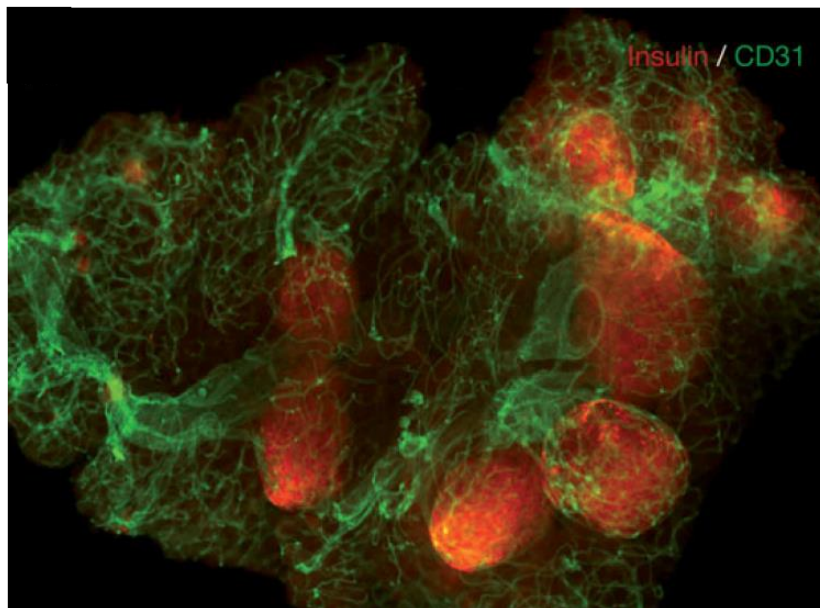


Figura 1: imagen tridimensional de microscopía confocal de islotes pancreáticos integrados en la estructura del páncreas. Inmunodetección doble de insulina (rojo) y CD31, un marcador endotelial (verde), que indican la presencia de los islotes y permiten apreciar la alta vascularización del tejido, respectivamente. (2)

Las células beta (β) suponen la mayor parte de las células del islote (en torno al 50-70% en humanos y 60-80% en ratones) y son las encargadas de la producción de insulina, mientras que otros tipos celulares como alfa, delta, gamma y épsilon (α , δ , γ y ϵ) se encuentran presentes en menor proporción y sintetizan y secretan otras hormonas características (glucagón, somatostatina, polipéptido pancreático y ghrelina, respectivamente) (fig. 2). La citoarquitectura del islote pancreático es diferente en humanos y ratones, de tal forma que las células δ suponen menos del 10% de las células de los islotes humanos, y menos del 5% en islotes de ratones (3).

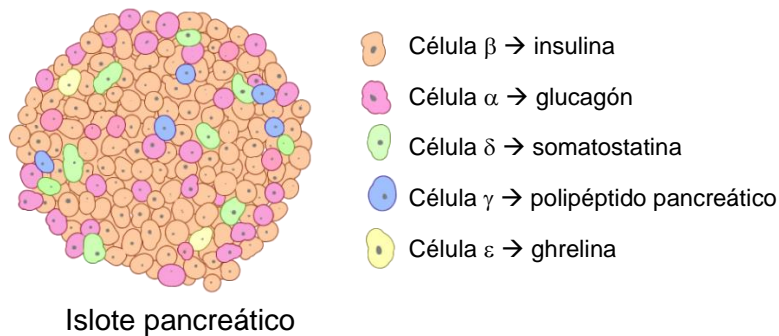


Figura 2: ilustración de distintos tipos celulares presentes en los islotes pancreáticos y sus hormonas características (modificado de ref. 4). Como podemos observar, las células β son mayoritarias y las δ se encuentran presentes en mucha menor proporción.

El páncreas endocrino se ocupa principalmente del mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, de tal manera que en respuesta a elevadas concentraciones de glucosa en sangre en periodo postprandial (hiperglucemia) las células β liberan insulina (5). La insulina es una hormona peptídica compuesta por 51 aminoácidos que se sintetiza y secreta como preproinsulina, una forma inactiva en la que la insulina se encuentra asociada al péptido C y a un péptido señal. La preprohormona sufre una serie de modificaciones por escisión proteolítica, plegamiento y empaquetado hasta generar la forma activa de la hormona (6). El receptor de insulina en las células diana es un receptor tirosina-quinasa transmembrana, en el que la unión de la hormona a los dominios extracelulares provoca la autofosforilación de los residuos de tirosina intracelulares y la activación de la vía de señalización (7). Esta vía permite, entre otras cosas, activar la internalización de la glucosa para ser metabolizada en las células diana tras la unión de la insulina a su receptor (8).

Por otro lado, en una situación de ayuno (hipoglucemia) las células α liberan glucagón, que activa en el hígado la escisión de moléculas de glucosa a partir de glucógeno (glucogenólisis) y la síntesis de glucosa *de novo* a partir de precursores (gluconeogénesis) para incrementar su disponibilidad en sangre (9).

El resto de las células del islote también tienen repercusión en la homeostasis de la glucosa, de tal forma que las células γ secretan polipéptido pancreático en situación de hiperglucemia, lo que inhibe la ingesta y promueve el gasto energético; y las células ϵ secretan ghrelina en situación de hipoglucemia (10,11) para estimular el apetito y promover la ingesta de alimento.

Las células δ también intervienen en la regulación de la homeostasis de la glucosa, liberando somatostatina en situación de hiperglucemia. La somatostatina es una hormona peptídica que se produce, además de en las células δ del páncreas, en

diversas regiones del organismo. La somatostatina pancreática es una isoforma de la hormona compuesta por 14 aminoácidos (12). En periodo postprandial, inhibe la secreción de la hormona del crecimiento, la somatotropina; así como el eje hipotálamo-hipofisario-tiroideo, el proceso digestivo y la absorción de nutrientes. Es importante en la regulación de la homeostasis de la glucosa porque tiene efecto paracrino sobre las células α y β de los islotes pancreáticos, inhibiendo la liberación de glucagón e insulina, respectivamente (13).

Diabetes Mellitus

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica que consiste en la incapacidad de quien la padece de internalizar y metabolizar la glucosa procedente de los alimentos. Ocurre cuando la producción de insulina o su acción sobre los tejidos diana están alteradas, por lo que tiene lugar una hiperglucemia persistente que conlleva diversas complicaciones adicionales e insuficiencia multiorgánica, y hace que los pacientes diabéticos sean más propensos a sufrir otras enfermedades, como infartos de miocardio, accidentes cerebrovasculares, neuropatías, retinopatías e insuficiencia renal (14). La diabetes se considera una epidemia global y provoca graves consecuencias sociales, económicas y sanitarias (15). En 2019, alrededor de 463 millones de personas padecían diabetes en todo el mundo, una enfermedad que se estima que en 2017 provocó 4 millones de fallecimientos y que constituye la novena causa más importante de muerte en el mundo. Para 2030, se prevé que 578 millones de personas padezcan esta enfermedad, una predicción que asciende a 700 millones en 2045 (16,17).

A grandes rasgos, existen mayoritariamente dos tipos de Diabetes Mellitus (DM):

- **Diabetes mellitus tipo 1 (DM1):** es una enfermedad de origen autoinmune que cursa con destrucción de las células β , lo que provoca la pérdida progresiva de función productora y secretora de insulina (18). Cuando esta destrucción es masiva y supera un determinado umbral, se manifiesta la enfermedad. Supone alrededor del 5% de casos de DM.
- **Diabetes mellitus tipo 2 (DM2):** ocurre como consecuencia de la aparición progresiva de una resistencia a la acción de la insulina en sus tejidos diana, que inicialmente se compensa incrementando la producción de hormona y la masa de células β por proliferación e hiperplasia celular (4,19). Esta compensación provoca inicialmente un estado de prediabetes, caracterizado por alta concentración de insulina en sangre (hiperinsulinemia) y niveles superiores a lo normal de glucosa en sangre (hiperglucemia leve), pero que no son lo suficientemente elevados como para

diagnosticar “franca diabetes”. Sin embargo, esta compensación termina causando estrés de retículo y otros eventos celulares y moleculares en las células β , que comienzan a fallar y finalmente mueren por agotamiento y apoptosis debida a glucotoxicidad y lipotoxicidad (20,21). Además, algunas investigaciones sugieren que la desdiferenciación y transdiferenciación de las células β a otros tipos de células endocrinas también juegan un papel importante en la aparición y la progresión de la DM2 (22) (fig. 3). La DM2 concentra aproximadamente el 95% de los casos de diabetes y su aparición se ve favorecida por determinados factores de riesgo, como la obesidad, el sedentarismo o el envejecimiento (14).

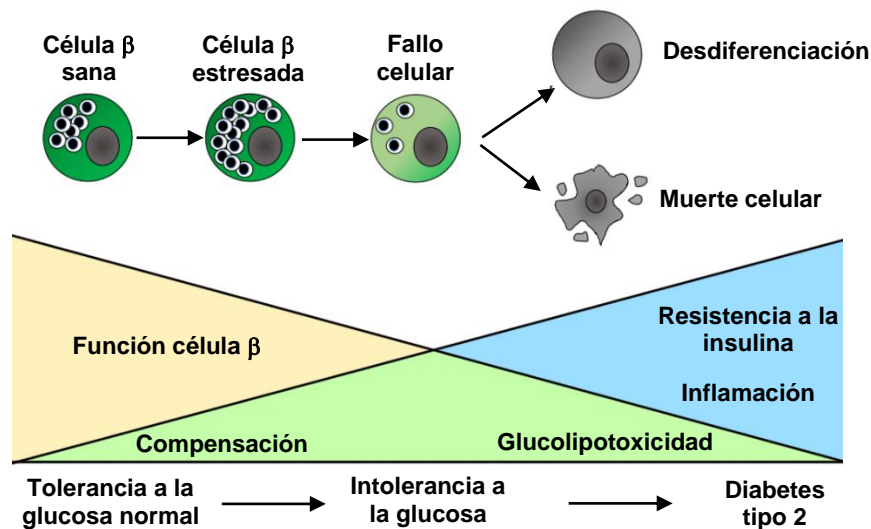


Figura 3: esquema de la progresión de la diabetes tipo 2, desde la aparición de la intolerancia a la glucosa hasta la desdiferenciación o muerte celular. (modificado de ref. 21)

La mayoría de las personas diabéticas necesitan un tratamiento farmacológico que ayuda a reducir los niveles de glucosa en sangre. Existe una amplia variedad de fármacos antidiabéticos, siendo los más habituales los agentes hipoglucemiantes y la administración de insulina exógena. La insulinización es una terapia de sustitución en la que la hormona se administra de forma exógena. La aplicación más común de la insulina es la inyección subcutánea y es el tratamiento más adecuado para los pacientes con diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2 de larga duración (23). Los agentes hipoglucemiantes son fármacos que modifican la homeostasis de la insulina, incrementando su secreción (secretagogos, como las sulfonilureas), retrasando su eliminación, o aumentando la sensibilidad de los tejidos diana a la hormona. Uno de los fármacos hipoglucemiantes más comunes es la metformina, un sensibilizador que incrementa la respuesta de los tejidos a la acción de la insulina. Requieren de una secreción residual de insulina, por lo que son la terapia de elección en el caso de los pacientes con enfermedad de corta duración que conservan cierta capacidad secretora (24).

Estudios previos han demostrado que los pacientes diabéticos presentan una alteración de la función endocrina pancreática que afecta no solo a las células β , sino también a otros tipos celulares que componen los islotes y regulan la homeostasis de la glucosa mediante la secreción de otras hormonas. Se ha observado que en diabéticos la función celular α está alterada y existe un incremento en la población de este tipo celular (hiperplasia), responsable de un incremento en la secreción de glucagón (25) que provoca un aumento de la concentración de esta hormona en sangre (hiper glucagonemia) (26). Hay evidencia de que tras una gran pérdida de masa celular β , como ocurre en diabetes, existe un cierto grado de plasticidad en las células endocrinas pancreáticas que permite la interconversión de células α a células β capaces de producir insulina, regenerando de esta forma parte de la población celular que se había perdido (27). Además, otras investigaciones recientes han demostrado que en pacientes diabéticos existe una disminución de la cantidad de células δ en los islotes, de manera que la desregulación de la secreción de somatostatina también podría estar implicada en el progreso de la enfermedad (28–33).

Así, nuestra hipótesis de partida es que las células δ pancreáticas se adaptan morfológica y funcionalmente en la aparición y desarrollo de la DM2, por lo que planteamos el estudio histomorfológico de esta población celular endocrina en diferentes modelos de prediabetes y DM2. Para ello, propusimos una serie de experimentos de inmunodetección doble de insulina y somatostatina en secciones de páncreas de humanos diabéticos y no diabéticos, islotes pancreáticos humanos tratados con insulina y páncreas de ratones modelo de diabetes tipo 2. El objetivo principal de este trabajo fue determinar si existen alteraciones en la población de células δ entre individuos no diabéticos e individuos diabéticos de diversa consideración y tratamiento, así como dilucidar si dichas alteraciones son una consecuencia más de la enfermedad o de la farmacología empleada.

Para lograr estos objetivos se llevaron a cabo técnicas de inmunodetección por fluorescencia en tejidos pancreáticos de humanos y de ratones, lo que permitió el análisis cualitativo de la histomorfolología del páncreas y los islotes pancreáticos en diferentes estadios de la enfermedad. Se cuantificaron las células productoras de hormonas insulina y somatostatina, así como el área correspondiente a cada una de ellas, y se establecieron parámetros para hacer análisis cuantitativos comparativos.

Materiales y métodos

Procedencia, tratamiento y procesado de las muestras

En este estudio se emplearon tres tipos de muestras biológicas: secciones de páncreas humanos, islotes pancreáticos humanos aislados y en cultivo, y secciones de páncreas de ratones en dieta estándar y diabética.

Los páncreas humanos proceden del biobanco del departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Fueron obtenidos a partir de necropsias realizadas en dicho hospital, siguiendo el protocolo autorizado por el Comité Ético de Investigación Clínica (código interno 12/202). Se fijaron en formaldehído al 4% durante 48-72 horas, tras lo cual se incluyeron en bloques de parafina. Se cortaron secciones de 5 micras de grosor y se montaron en portaobjetos.

Los pacientes, con edades comprendidas entre 40 y 80 años, se dividieron en tres grupos en función de su estado fisiopatológico antes de la muerte: controles sanos (Control), pacientes diabéticos tipo 2 con tratamiento con antidiabéticos orales (ADO, principalmente metformina) y pacientes diabéticos tipo 2 con tratamiento de insulina. Las muestras seleccionadas se agruparon en función del sexo y del tipo de tratamiento, y en algunos casos también se conoce la causa de la muerte, ya que podría afectar al estado del páncreas (tabla 1).

Sexo	Grupo	Muestra	Tratamiento	Causa de la muerte
Mujeres	Control	MC1	Ninguno	Desconocida
		MC15		Estatus epiléptico
		MC21		Shock séptico
		MC22		Síndrome de dificultad respiratoria aguda
		MC27		Desconocida
		MC28		Shock cardiogénico
	ADO	MA9	Metformina	Hemorragia cerebral
		MA13	Metformina	Tromboembolismo pulmonar masivo
		MA16	Desconocido	Desconocida
		MA19	Metformina	Shock postoperatorio
	Insulina	MI5	Insulina (desconocido)	Insuficiencia respiratoria
		MI6	Insulina (NPH)	Shock cardiogénico
		MI9	Insulina (Lantus)	Aspergilosis pulmonar
MI12		Insulina (desconocido)	Sepsis urológica	
Hombres	Control	HC10	Ninguno	Insuficiencia respiratoria
		HC14		Desconocida
		HC23		Fallo multiorgánico
		HC25		Fallo multiorgánico
		HC30		Shock séptico
	ADO	HA5	Desconocido	Desconocida
		HA7	Metformina	Desconocida
		HA11	Metformina	Shock cardiogénico
		HA15	Desconocido	Shock séptico
		HA16	Desconocido	Shock séptico
		HA20	Desconocido	Desconocida
		HA21	Desconocido	Desconocida
	Insulina	HI2	Insulina (desconocido)	Shock séptico
		HI15	Insulina (Mixtard 30)	Edema pulmonar agudo

	HI16	Insulina (NPH)	Shock cardiogénico
	HI18	Insulina (desconocido)	Shock séptico

Tabla 1: clasificación de los pacientes cuyos páncreas fueron incluidos en este estudio, en función del sexo y del tipo de tratamiento. Detalle del tipo de tratamiento; antidiabético oral empleado, en el caso de los ADO; y marca de la insulina, en el caso de los insulinizados. Especificación de la causa de la muerte.

Los islotes humanos procedían de un individuo control sano (H2235) y se obtuvieron del Laboratorio de Terapia Celular de la Diabetes (LTCD) del Centro Hospitalario Universitario (CHU) de Montpellier. Se dividieron en dos grupos, de los cuales uno fue el grupo control y el otro se trató con insulina en concentración 500 nM durante 1 hora. Se fijaron en formalina al 10% durante 1 hora y se incluyeron en bloques de parafina. Se cortaron láminas de 5 micras de grosor que se montaron en portaobjetos para la inmunodetección posterior. Se seleccionó un portaobjetos de cada una de las condiciones y se agruparon en grupo control y grupo tratado con insulina 1 hora.

Los páncreas de ratones proceden de ratones wild type C57BL/6J alojados en el animalario de la Universidad de Valladolid. Se dividieron en dos grupos y se les alimentó con dieta normal (Standard Diet, SD; Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany #V1534-703 19% proteína, 3,3% grasa) o dieta alta en grasas (High Fat Diet, HFD; Research Diets #D12451 35% carbohidratos, 45% grasa) durante 8 semanas. Posteriormente fueron sacrificados y se extrajeron sus páncreas. Se fijaron por inmersión en formalina al 10% durante toda la noche, y al día siguiente se incluyeron en bloques de parafina. Se cortaron en láminas seriadas de cinco micras de grosor y se montaron en portaobjetos. Se agruparon las muestras en función del tipo de dieta, y se seleccionaron 4 individuos con SD y 3 con HFD.

En total, se seleccionaron 30 muestras de páncreas humanos, repartidas entre los dos sexos y los tres tipos de tratamiento; 7 muestras de páncreas de ratones, divididas entre los dos tipos de dieta; y 2 portaobjetos con islotes humanos, uno para el grupo control y otro para el tratamiento con insulina 500 nM 1 hora (tabla 2).

Tipo de muestra	Grupo			
		Control	ADO	Insulina
Páncreas humanos	Mujeres	N=6	N=4	N=4
	Hombres	N=5	N=7	N=4
	Total	N=11	N=11	N=8
Páncreas de ratón	SD	HFD		
	N=4	N=4		
Islotes humanos	Control	Insulina 1 hora		
	N=1 (11 islotes)	N=1 (11 islotes)		

Tabla 2: número de muestras seleccionadas, clasificadas en función del tipo de muestra y del grupo al que pertenecen.

Immunodetección de insulina y somatostatina

Se adaptó un protocolo de inmunodetección doble de insulina y glucagón en secciones de páncreas para inmunodetección doble de insulina y somatostatina en diversos tipos de muestras. Se probaron diferentes tiempos de desparafinado y rehidratación de las muestras, desenmascaramiento del antígeno, bloqueo e incubación de los anticuerpos, así como distintas combinaciones de anticuerpos primarios y secundarios para inmunofluorescencia en cada tipo celular en diferentes fluoróforos, hasta que se logró una inmunofluorescencia adecuada en cada caso. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados son los mismos en todos los casos (tabla 3).

Anticuerpos primarios	Referencia	Anticuerpos secundarios	Referencia
Policlonal anti-insulina de conejo	Abcam Rb pAb to insulin 1 mg/mL. Ref.: ab63820	Anti-conejo marcado con fluoróforo 594	Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (H+L) 2 mg/mL. Ref: A11012
Monoclonal Anti-somatostatina de ratón	Invitrogen somatostatin monoclonal antibody (7G5) 1 mg/mL. Ref.: MA5-17182	Anti-ratón marcado con fluoróforo 488	Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) 2mg/mL. Ref: A11001

Tabla 3: combinación de anticuerpos primarios y secundarios empleados en todos los protocolos de detección por inmunofluorescencia.

- Immunodetección de insulina y somatostatina en páncreas humanos y de ratones.

Los protocolos para la detección mediante inmunofluorescencia de insulina y somatostatina en páncreas humanos y de ratones fueron idénticos. Se desparafinaron las muestras por inmersión en xileno durante 15 minutos, y posteriormente se rehidrataron por inmersión en una batería de alcoholes de concentración decreciente (100%, 95%, 80% y 70%), 10 minutos en cada uno. Se hicieron dos lavados de 5 minutos cada uno en tampón fosfato salino 1x (PBS1x; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM).

Para eliminar los posibles enlaces formados entre el formaldehído y el antígeno durante el proceso de fijación, se llevó a cabo un desenmascaramiento antigénico (o recuperación antigénica) con citrato sódico a pH=6 y en calor húmedo, usando un hervidor de vapor, durante 30 minutos. Posteriormente se dejó atemperar durante media hora.

En cámara húmeda se realizaron tres lavados con PBS1x de 5 minutos cada uno. Tras ello se aplicó la solución de bloqueo (Suero de cabra: Normal Goat Serum NGS 2%, Albúmina Sérica Bovina BSA 10%, Tritón X-100 0,1%, en PBS1x) durante 1 hora, a temperatura ambiente, para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos primarios. Tras esto se incubó con los dos anticuerpos primarios, anti-insulina de conejo (en concentración 1/200 en solución de bloqueo) y anti-somatostatina de ratón (en concentración 1/100 en solución de bloqueo), en cámara húmeda toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se sacó la cámara húmeda del frigorífico y se dejó atemperar unos 15 minutos, tras lo cual se retiró el anticuerpo primario y se hicieron tres lavados con PBS1x de 5 minutos cada uno. Se volvió a bloquear con la misma solución de bloqueo empleada el día anterior, para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo secundario, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se incubó con los dos anticuerpos secundarios unidos a fluoróforos específicos para fluorescencia roja y verde, 594 anti-conejo y 488 anti-ratón respectivamente (ambos a concentración 1/1000 en solución de bloqueo), en cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad durante media hora.

Se hicieron tres lavados con PBS1x de 5 minutos cada uno y se montaron las preparaciones con Fluoroshield + DAPI (que incluye un marcador nuclear) y cubreobjetos. Las muestras se dejaron secar y se almacenaron en frío y en oscuridad hasta la toma de fotografías.

- **Inmunodetección de insulina y somatostatina en islotes humanos.**

El protocolo de inmunodetección de insulina y somatostatina en islotes humanos presentó ligeras variaciones con respecto a la inmunofluorescencia empleada en secciones de páncreas.

Las muestras se desparafinaron mediante inmersión en xileno durante 15 minutos, y posteriormente se rehidrataron por inmersión en una batería de alcoholes de concentración decreciente. En etanol al 100% se dejaron 10 minutos, y en los sucesivos (95%, 80% y 70%) 3 minutos. Posteriormente se hicieron dos lavados en PBS1x de 5 minutos cada uno.

En este protocolo no se llevó a cabo desenmascaramiento. Se puso directamente la solución de bloqueo en cámara húmeda durante 1 hora a temperatura ambiente para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos primarios.

Transcurrida 1 hora, se eliminó la solución de bloqueo y se incubó con los anticuerpos primarios, anti-insulina de conejo (1/100) y anti-somatostatina de ratón (1/50) durante toda la noche en cámara húmeda y a 4°C.

Al día siguiente, se sacó la cámara húmeda del frigorífico y se dejó atemperar durante 10 minutos. Se eliminó el anticuerpo primario y se hicieron tres lavados con PBS1x de 5 minutos cada uno. Tras esto no se volvió a bloquear, como se hacía en el protocolo de páncreas, sino que directamente se incubó con los anticuerpos secundarios. Se usaron los anticuerpos 594 anti-conejo y 488 anti-ratón, ambos a concentración 1/1000, durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad.

Finalmente, se hicieron tres lavados con PBS1x de 5 minutos cada uno y se montaron las preparaciones con Fluoroshield+DAPI (que incluye un marcador nuclear) y cubreobjetos. Se dejaron secar y se almacenaron en frío y en oscuridad hasta la toma de fotografías.

Microscopía

Para la toma de las fotografías se utilizaron dos microscopios, de epifluorescencia y confocal. La mayoría de las fotos se hicieron en Microscopio de Fluorescencia NIKON Eclipse 90i asociado a una cámara CCD de NIKON, modelo DS-Ri2. Se utilizaron filtros para la detección simultánea de los fluoróforos DAPI (azul), FITC (verde) y TRITC (rojo), correspondientes en nuestro caso a la identificación de núcleos, células delta y células beta, respectivamente, acorde al protocolo de inmunofluorescencia indicado anteriormente. La intensidad de fluorescencia se ajustó de forma específica en cada protocolo, siempre distinguiendo de forma inequívoca las células positivas, reduciendo al mínimo la señal de fondo. Se usaron dos objetivos, 20x y 40x, en función del tamaño del islote, de forma que en el campo cupiera el islote entero a la hora de tomar la fotografía. Las fotografías se tomaron en resolución 1636x1088 píxeles y se guardó una fotografía en formato RGB para cada canal (rojo, verde y azul).

Otras fotografías se tomaron en un Microscopio Confocal para comprobar posibles colocalizaciones de las dos hormonas estudiadas, insulina y somatostatina, en células dobles positivas. Se utilizó un Microscopio Confocal Leica TCS SP5 con láser blanco, y se seleccionaron las longitudes de onda correspondientes al DAPI (azul), 488 (verde) y 594 (rojo). Se utilizó el objetivo 60x. Las fotografías se tomaron en resolución 512x512 píxeles y se guardaron en formato multicanal, con un canal para cada fluoróforo.

Se fotografiaron en total 50 islotes de cada una de las 30 muestras de páncreas humano, todos los islotes presentes en cada una de las 7 muestras de páncreas de ratón (con números comprendidos entre 6 y 15) y todos los islotes presentes en cada una de las 2 muestras de islotes humanos (11 de cada muestra).

Cuantificaciones

Para la cuantificación se utilizó el software Fiji ImageJ 2.1.0. Se delimitó y midió el área total de cada islote en píxeles, y se consideraron todos los núcleos marcados con DAPI contenidos en esta área como núcleos totales del islote. Considerando como positivas las células con una señal para la hormona claramente distinguible de la señal de fondo, se contaron las células positivas para insulina (células β) y positivas para somatostatina (células δ) en cada islote, y se midió el área positiva en píxeles para cada tipo de hormona.

Cálculos, análisis estadístico y representación gráfica

En el caso de las fotografías tomadas con el microscopio NIKON Eclipse 90i, en una fotografía con resolución 1636x1088 en el objetivo 20x cada píxel equivale a 0,44 micras, y en el objetivo 40x cada píxel equivale a 0,22 micras. Con respecto a las fotos realizadas en el microscopio confocal, en una fotografía con resolución 512x512 píxeles en el objetivo 60x cada píxel equivale a 0,96 micras. Las áreas se transformaron de píxeles a micras teniendo en cuenta estas conversiones.

Con los datos de áreas y número de células obtenidos, se calcularon en Excel las proporciones siguientes para cada islote, en los tres tipos de muestras (páncreas humano, de ratones e islotes humanos):

- Proporción número de células beta/número de núcleos totales del islote.
- Proporción número de células delta/número de núcleos totales del islote.
- Proporción área de células beta/área total del islote.
- Proporción área de células delta/área total del islote.
- Tamaño de las células beta (área beta/número de células beta)
- Tamaño de las células delta (área delta/número de células delta).

En el caso de las muestras de páncreas de humano y de ratón se hizo la media aritmética de las proporciones calculadas con todos los islotes en cada muestra, obteniendo un único valor de cada parámetro para cada individuo. Los valores se

agruparon por sexo y por tratamiento del paciente. Los valores correspondientes a ratones se agruparon por tipo de dieta. En el caso de los islotes de humanos, se consideró cada islote de forma individual y los valores se agruparon en grupo control y grupo con tratamiento con insulina.

Para el análisis estadístico y la representación gráfica de los datos se utilizó el software GraphPad Prism 8.0.2. Al tener una población inferior a 30 en todos los tipos de muestra, primero se comprobó si los datos seguían una distribución normal y se analizó la posible presencia de outliers, que fueron excluidos.

En el caso de los datos que sí se ajustaban a una distribución normal, se aplicó t-test para comparar las medias de dos grupos de datos, y análisis de la varianza unidireccional (one-way ANOVA) para comparar las medias de tres o más grupos de datos. Por otro lado, para los datos que no seguían una distribución normal se utilizaron test de Kruskal-Wallis para comparar las medias de tres o más grupos de datos, y test de Mann-Whitney para comparar las medias de dos grupos de datos.

En el caso de las muestras de páncreas de humanos, se compararon entre sí tanto los tres grupos (control, ADO e insulina) utilizando ANOVA, como solo dos de ellos (control e insulina) utilizando t-test. Además, los análisis se realizaron tanto de forma individual para cada sexo como sin distinción por sexos.

Para las muestras de páncreas de ratón y de islotes humanos, al haber solo dos grupos en cada tipo de muestra (dieta estándar o alta en grasas, y controles o tratamiento de insulina durante 1 hora, respectivamente), y en función de la distribución de los datos, se aplicaron t-test o test de Mann-Whitney para comparar las medias de dos grupos.

Resultados

Se obtuvieron fotografías de los tres tipos de muestras (figs. 4, 8 y 10), cuyas células β y δ fueron marcadas con inmunofluorescencia en rojo y verde, respectivamente. Se cuantificaron en cada islote fotografiado el número de células productoras de insulina y somatostatina y el área que ocupaban estas.

En las fotografías tomadas en microscopio confocal no se observaron colocalizaciones de las dos hormonas, por lo que no se presenta esta cuantificación.

Las cuantificaciones nos permitieron calcular diversos parámetros y comparar entre sí las condiciones estudiadas para cada tipo de muestra.

a. Estudios en secciones de páncreas humanos

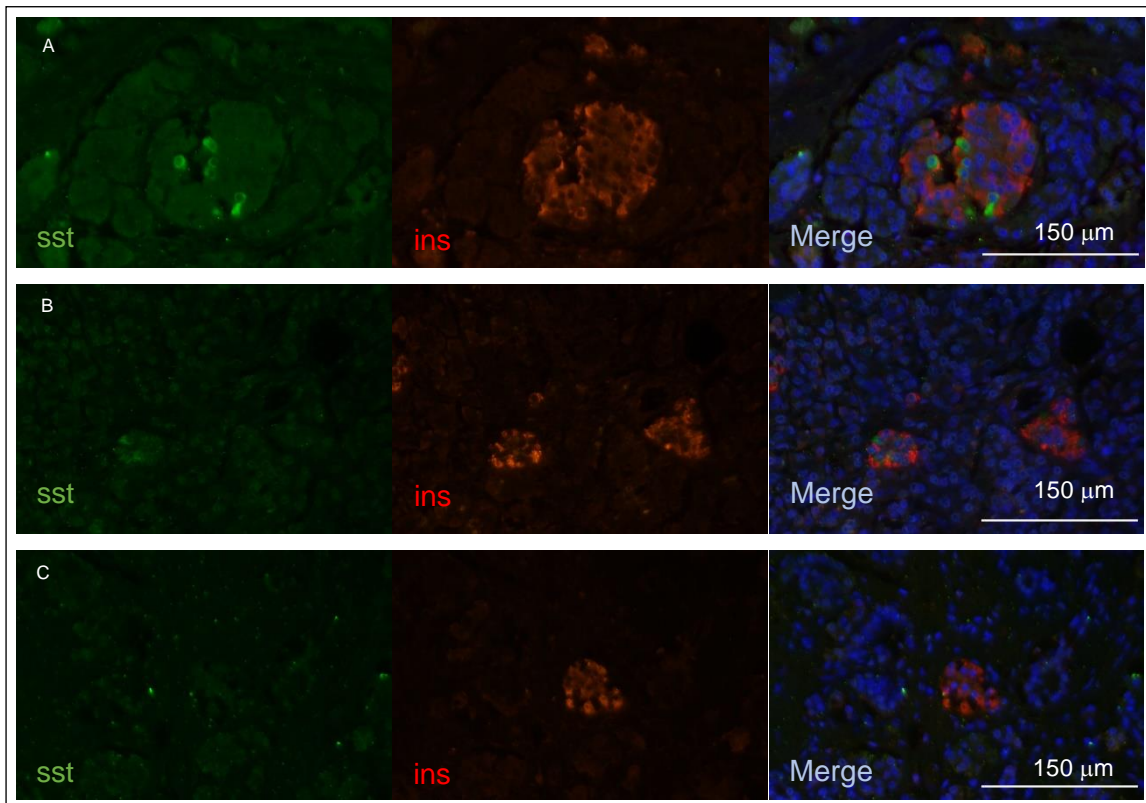


Figura 4: imágenes representativas de las fotografías tomadas en microscopio de epifluorescencia de las muestras de secciones de páncreas humanos. Imágenes correspondientes a la inmunofluorescencia de somatostatina (sst, verde); insulina (ins, rojo) y la fusión de los canales de las dos hormonas junto con la inmunofluorescencia de núcleos (Merge). Se muestran fotografías de la muestra control HC14 (A), la muestra HA5 del grupo tratado con antidiabéticos orales (B) y la muestra HI16 del grupo tratado con insulina (C).

Población y área de células β

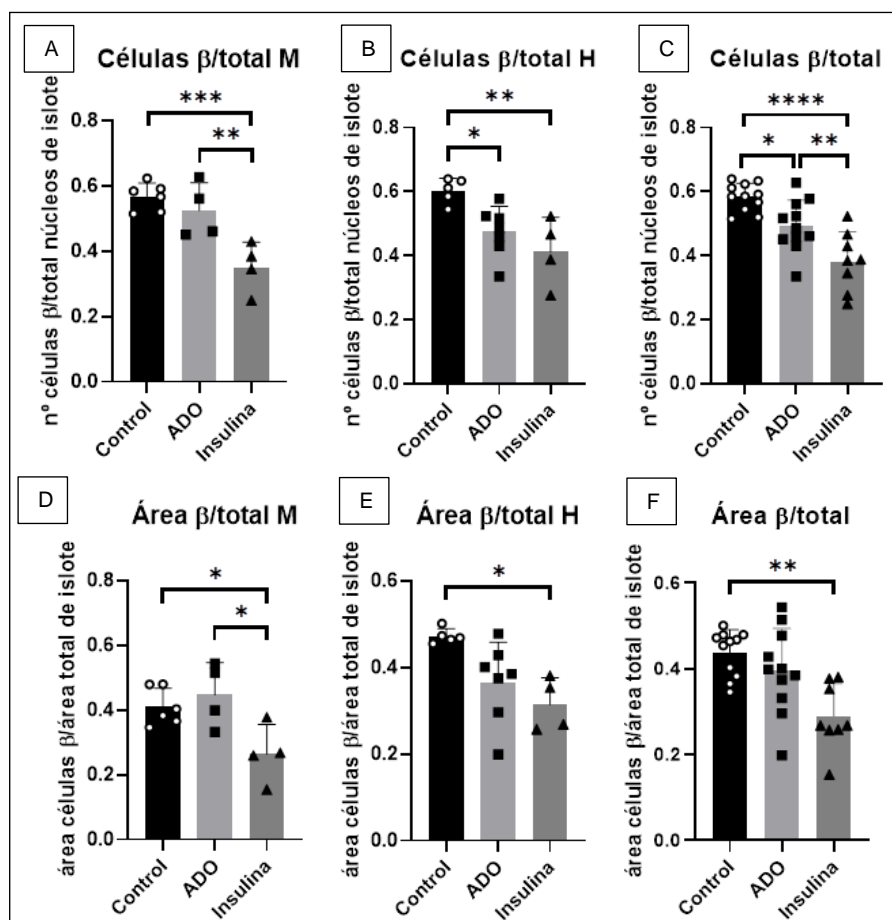


Figura 5: representación gráfica de las proporciones población de células β /total de células del islote (A, B, C) y área β /área total del islote (D, E, F) en secciones de páncreas humanos, agrupadas por condición: Control, tratamiento con antidiabéticos orales (ADO) y pacientes insulinizados (insulina). Representación por sexos: Mujeres (M) y Hombres (H); y para el total de las muestras sin distinción.

Los resultados del cálculo del parámetro células β /total de núcleos del islote en mujeres (Fig. 5A) muestran diferencias significativas entre pacientes control e insulinizadas y entre los dos grupos de diabéticas con distinto tratamiento; mientras que en hombres (Fig. 5B) estas diferencias son significativas entre el grupo control y los dos grupos de diabéticos, pero no entre los dos grupos de pacientes diabéticos. Para el conjunto total de las muestras (Fig. 5C) existen diferencias significativas en la población de este tipo celular entre pacientes sanos y los dos grupos de pacientes diabéticos, así como entre los dos grupos de diabéticos con distinto tipo de tratamiento.

Para el parámetro área de células β /área total del islote, en mujeres (Fig. 5D) existen diferencias significativas en el grupo de insulinizadas con respecto al control y al grupo de diabéticas tratadas con ADO. En hombres (Fig. 5E) la estadística solo es significativa entre el grupo control y el grupo de insulinizados, pero podemos hablar de una tendencia ($p=0,0539$) en la comparación de los grupos control y diabéticos tratados con ADO. En

el análisis del conjunto de las muestras sin distinción por sexos (Fig. 5F), las diferencias son significativas entre el grupo control y el grupo de diabéticos insulinizados y existe tendencia ($p=0,0522$) entre los grupos control y diabéticos tratados con ADO.

Población y área de células δ

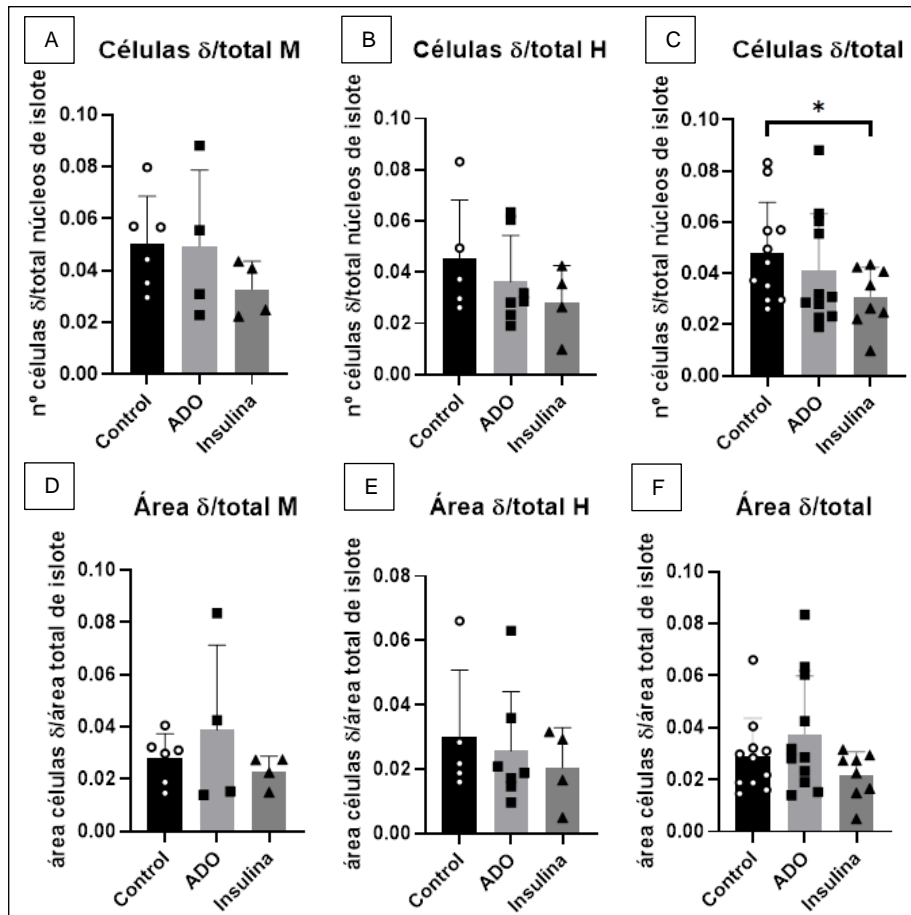


Figura 6: representación gráfica de las proporciones células δ /total de células del islole (A, B, C) y área δ /área total del islole (D, E, F) en secciones de páncreas humanos, agrupadas por condición: Control, tratamiento con antidiabéticos orales (ADO) y pacientes insulinizados (insulina). Representación por sexos: Mujeres (M) y Hombres (H); y para el total de las muestras sin distinción.

No se observaron diferencias en la proporción de células delta con respecto al total de células del islole cuando separamos las células por sexo (Fig. 6A, B). Sin embargo, sí observamos una disminución significativa cuando se comparan entre sí los grupos control y diabéticos insulinizados considerando el total de las muestras, sin hacer distinción por sexos (Fig. 6C).

No se observan diferencias en la ratio área δ /área total del islole, tanto teniendo en cuenta el sexo como considerando las muestras únicamente por condición y tratamiento (Fig. 6 D-F).

Tamaño medio de las células β y δ

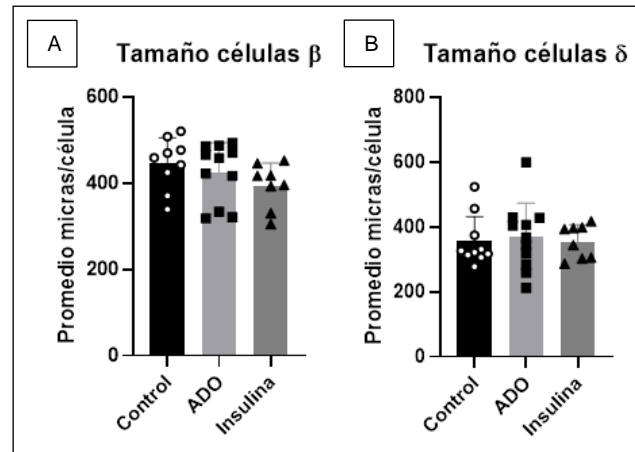


Figura 7: representación gráfica del tamaño promedio de las células β productoras de insulina (A) y δ productoras de somatostatina (B) en secciones de páncreas humanos, calculado para cada muestra como el promedio del área en micras/número de células del islote. Valores agrupados por tipo de muestra y sin distinción por sexos.

No hay variaciones en el tamaño medio de las células β y δ (Fig. 7A, B), comparando las distintas condiciones.

b. Estudios en islotes humanos tratados con insulina

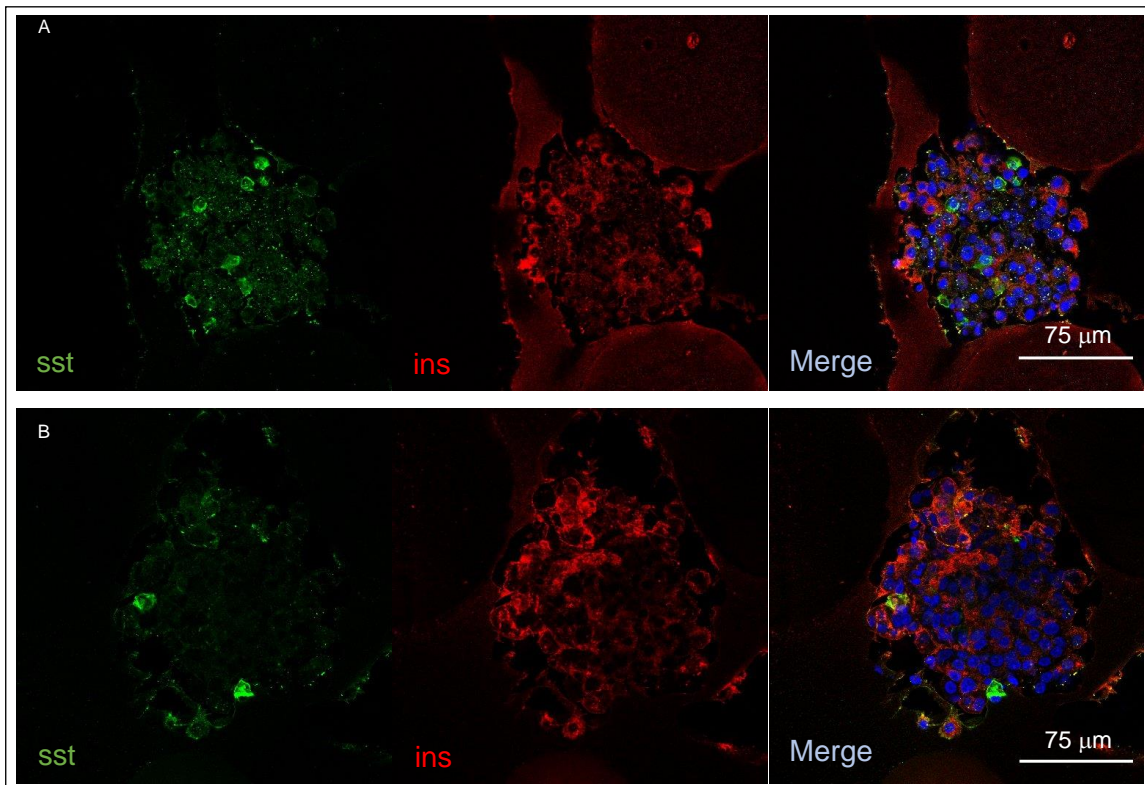


Figura 8: imágenes representativas de las fotografías tomadas en microscopio confocal de las muestras de islotes humanos tratados con insulina. Imágenes correspondientes a la inmunofluorescencia de somatostatina (sst, verde); insulina (ins, rojo) y la fusión de los canales de las dos hormonas junto con la inmunofluorescencia de núcleos (Merge). Se muestran fotografías de un islote del grupo control (A) y un islote del grupo tratado con insulina (B).

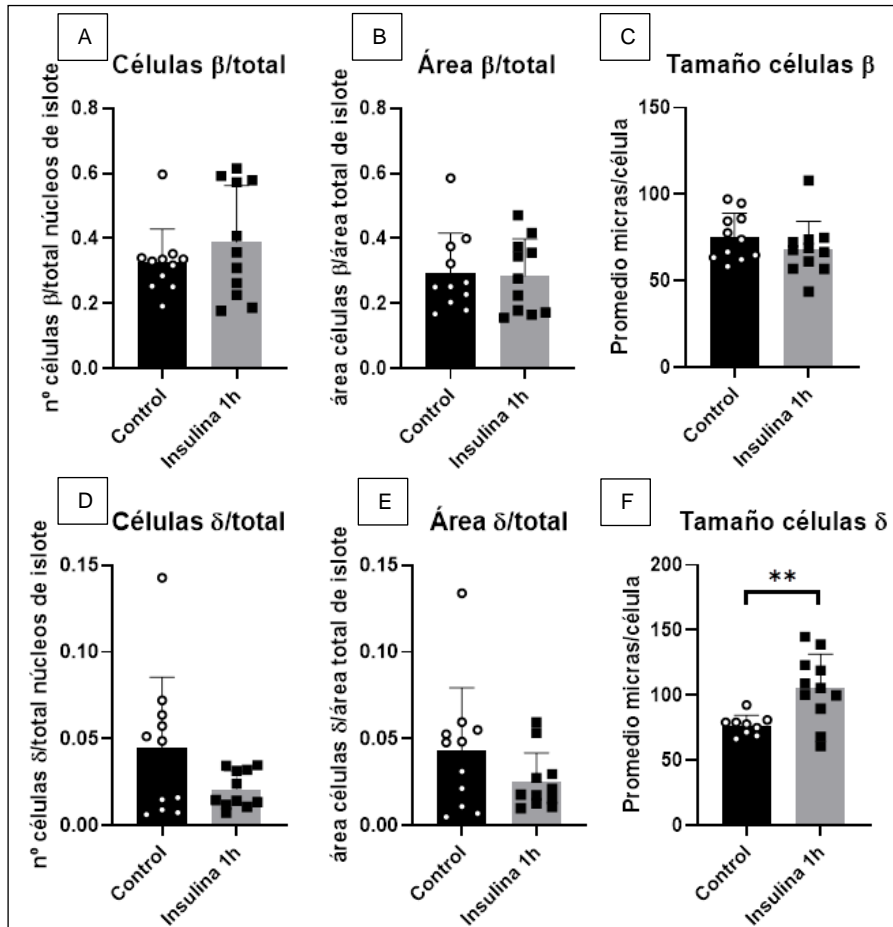


Figura 9: representación gráfica de las proporciones calculadas a partir de las cuantificaciones de la inmunodetección de somatostatina e insulina en islotes humanos, agrupados según pertenezcan al grupo control o al grupo tratado con insulina 1 hora. (A): células β /total de células del islote; (B): área de células β /área total del islote; (C): tamaño medio de las células β ; (D) células δ /total de células del islote; (E) área de células δ /área total del islote; (F) tamaño medio de las células δ .

Dado que en las muestras de páncreas humanos observamos una disminución de células δ en pacientes insulinizados, quisimos estudiar si esta variación pudiera deberse a la patología o al tratamiento. Así, el siguiente paso que dimos fue tratar islotes humanos con insulina. No se observan diferencias entre el grupo control y los islotes tratados con insulina 500 nM durante 1 hora con respecto a las proporciones de células y área de células β frente al total del islote (Fig. 9A, B). Tampoco hay variaciones en el tamaño medio de las células β entre los dos grupos (Fig. 9C).

No hay variaciones en las proporciones de células δ y área de células δ en los islotes tratados con insulina durante 1 hora con respecto al control. Sí que hay un aumento significativo del tamaño medio de las células δ en los islotes tratados con insulina frente a los islotes pertenecientes al grupo control.

c. Estudios en secciones de páncreas de ratones

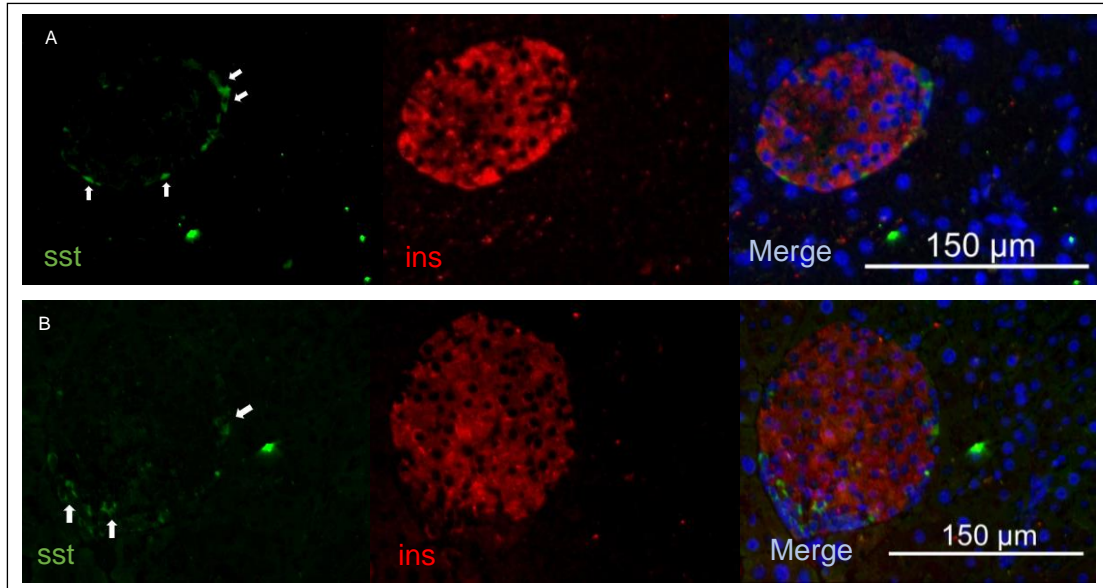


Figura 10: imágenes representativas de las fotografías tomadas en microscopio de epifluorescencia de las muestras de páncreas de ratones. Imágenes correspondientes a la inmunofluorescencia de somatostatina (sst, verde); insulina (ins, rojo) y la fusión de los canales de las dos hormonas junto con la inmunofluorescencia de núcleos (Merge). Se muestran fotografías de la muestra SD32.1 del grupo con dieta estándar (A) y 26.1 del grupo con dieta alta en grasa (B).

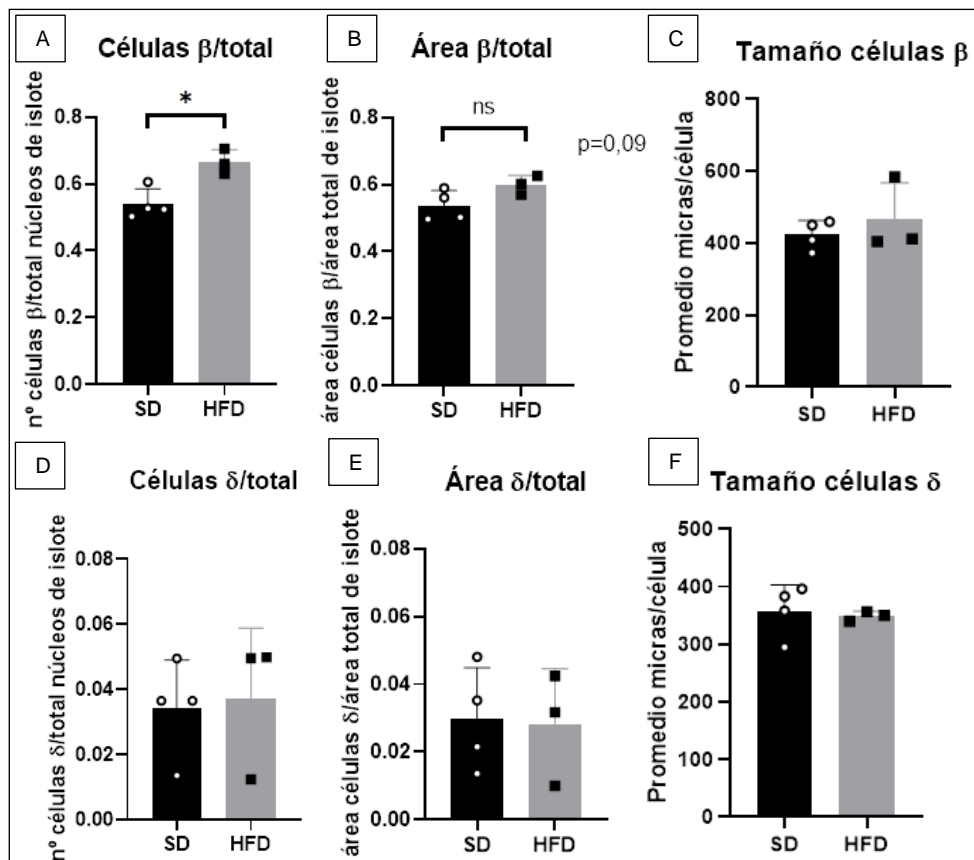


Figura 11: representación gráfica de las proporciones calculadas a partir de las cuantificaciones de las muestras de páncreas de ratones, agrupadas en función del tipo de dieta: estándar (SD) o alta en grasa (HFD). (A): células β/total de células del islote; (B): área de células β/área total del islote; (C): tamaño medio de las células β; (D) células δ/total de células del islote; (E) área de células δ/área total del islote; (F) tamaño medio de las células δ.

Llevamos a cabo un estudio histomorfológico de páncreas de ratones alimentados con dieta alta en grasa (HFD), utilizados frecuentemente como modelo de prediabetes, para determinar si existe alteración de la población de células δ en una situación de alta demanda de insulina. En los ratones con dieta alta en grasa existe un aumento significativo de la proporción de células β en el total del islote con respecto a los ratones con dieta estándar (SD) (Fig. 11A), así como una tendencia al incremento del área que ocupan dichas células (Fig. 11B). El tamaño medio de las células β no varía entre estos dos grupos (Fig. 11C), y tampoco lo hacen las proporciones de células y área de células δ en el total del islote (Fig. 11D, E) o el tamaño medio de las células δ (Fig. 11F).

Discusión

Considerando los resultados obtenidos en páncreas humanos, en los que hemos comparado individuos no diabéticos con diabéticos tratados con antidiabéticos orales o insulina, podemos apreciar que existe una disminución de la población de células β asociada a la evolución de la diabetes tipo 2, así como del tamaño celular. La pérdida se acentúa en los pacientes insulinizados, que son los pacientes diabéticos de larga duración que han recibido un tratamiento crónico de insulina. Estos resultados respaldan lo observado por otros autores y por nosotros mismos en estudios anteriores, que demuestran que en DM2 existe una disminución de masa β que contribuye a la alteración en la homeostasis de la glucosa (34,35). Es decir, en nuestro estudio se confirman previos resultados en páncreas humanos y se valida el funcionamiento de la técnica de inmunodetección empleada.

En lo que respecta a las células δ , productoras de somatostatina, en páncreas humanos describimos que los pacientes diabéticos insulinizados de larga duración presentan una disminución significativa de esta población celular. Nuestros resultados están en línea con lo ya descrito anteriormente en investigaciones realizadas en varios modelos animales, así como en humanos (28–30), en los que se describe que en diabéticos, además de haber una pérdida de masa celular δ , estas células presentan alteraciones estructurales y funcionales que podrían tener un papel importante y aún desconocido en el desarrollo y la progresión de la enfermedad (36). Sin embargo, estos estudios compararon individuos diabéticos frente a controles, pero no distinguieron subgrupos de diabéticos en función de su tratamiento. Nosotros empleamos dos tipos de muestras de diabéticos (tratados con antidiabéticos orales o insulinizados) que se consideraron como grupos independientes entre sí. Esta subdivisión nos permitió estudiar la variación en la composición de los islotes entre grupos con distinta duración de la enfermedad, algo que hasta ahora no se había concretado, y determinar que la disminución de la población de células δ se agudiza con el avance de la diabetes. Es decir, no es tan evidente en pacientes tratados con antidiabéticos orales, pero gana protagonismo en los pacientes insulinizados diabéticos de larga duración.

Eso nos llevó a preguntarnos si esta disminución de población celular δ se podría deber a la evolución de la enfermedad o a la propia insulinización, por lo que planteamos un experimento de inmunodetección de insulina y somatostatina en islotes humanos aislados de un individuo sano tratados in vitro con insulina exógena durante 1 hora. Los resultados obtenidos revelan que existe un incremento del área celular media de las células δ en los islotes tratados con insulina. Este incremento podría deberse a una

hiperfunción celular en respuesta al tratamiento de insulina de corta duración, de tal forma que las células δ responderían a la insulina exógena hipersecretando somatostatina. Esta hiperfusión de vesículas de secreción de somatostatina provocaría una expansión de la membrana de las células δ que resultaría en un aumento del área celular. Se sabe que las células δ expresan gran variedad de receptores para diversas hormonas y neurotransmisores, incluyendo receptores de insulina (13,37), pero los efectos de la insulina sobre las células δ no están claros. Los estudios existentes al respecto proporcionan datos contradictorios, afirmando que la insulina inhibe (38), estimula (39) o no afecta (40) a la secreción de somatostatina en células δ . Teniendo todo esto en consideración, tendríamos que realizar un estudio más amplio para validar esta hipótesis.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se observó que, en condiciones de una demanda extraordinaria de insulina, como es el embarazo, existe una disminución de la población de células δ . Esta disminución podría ser compatible con un mecanismo de reprogramación de células δ a β para incrementar la insulina circulante disponible (41), necesaria para el control metabólico de la gestación, en la que se produce resistencia insulínica. Otras investigaciones han manifestado también que existe una conversión de células δ a β que es dependiente de la edad (42). Por ello, planteamos la posibilidad de que, en otro contexto de alta demanda metabólica y riesgo para el desarrollo de DM2, como es la obesidad, pudiera existir también esta plasticidad entre células δ y β . Para probar esta hipótesis llevamos a cabo el protocolo de inmunodetección doble de insulina y somatostatina en páncreas de ratones wild type, divididos en dos grupos en función de su dieta (estándar o alta en grasa). Los ratones alimentados con dieta alta en grasa se utilizan habitualmente como modelo preclínico de prediabetes tipo 2, y permiten estudiar la compensación que tiene lugar antes de la aparición de la enfermedad, cuando el páncreas incrementa la producción de insulina a medida que se desarrolla la resistencia periférica a la acción de la hormona (43). Los ratones con dieta alta en grasa de nuestro estudio desarrollaron obesidad y presentaron un fenotipo prediabético, con intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia. Los resultados obtenidos en el experimento de inmunodetección manifiestan un incremento significativo de la proporción de células y área correspondiente a células β presentes en los islotes de páncreas de ratones con dieta alta en grasa, frente a los ratones con dieta estándar. En estudios previos en sujetos obesos y diabéticos ya se había visto que existe hiperplasia y proliferación de células β como mecanismo compensatorio, en respuesta al incremento de la demanda de insulina (44–46).

Sin embargo, no hay alteraciones en la masa celular δ de los ratones con dieta alta en grasa en comparación con los controles, y tampoco se observaron en las inmunodetecciones células dobles positivas a insulina y somatostatina. Esto nos hace pensar que los cambios en este tipo celular observados previamente en ratonas preñadas, así como la reprogramación de δ a β , podrían estar mediados por hormonas presentes en el embarazo, como los estrógenos, y no por la desregulación metabólica. Al no existir estas alteraciones en las muestras analizadas, deducimos que una alta demanda metabólica por sí sola no es suficiente para inducir estos cambios de poblaciones celulares en los islotes pancreáticos, al menos en las condiciones estudiadas.

Conclusiones

1. En páncreas humanos existe una disminución de la población y área celular δ en pacientes diabéticos frente a individuos sanos, que se agudiza en los diabéticos insulinizados de larga duración.
2. El tratamiento de islotes humanos con insulina durante 1 hora no altera la composición celular de los islotes, pero sí provoca un aumento del área de las células δ compatible con una respuesta hipersecretora de somatostatina frente a la acción de la insulina de corta duración.
3. No hay variación en la población δ en ratones modelo de prediabetes, por lo que la reprogramación de δ a β observada en este modelo en otras situaciones de estrés metabólico probablemente se deba a factores adicionales, como la regulación hormonal.

Bibliografía

1. Jain R, Lammert E. Cell-cell interactions in the endocrine pancreas. *Diabetes, Obes Metab.* 2009;11(SUPPL. 4):159–67.
2. El-Gohary Y, Sims-Lucas S, Lath N, Tulachan S, Guo P, Xiao X, et al. Three-Dimensional Analysis of the Islet Vasculature. *Anat Rec.* 2012;295(9):1473–81.
3. Dolenšek J, Rupnik MS, Stožer A. Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets.* 2015;7(1).
4. Rodríguez-Comas J, Ramón-Azcón J. Islet-on-a-chip for the study of pancreatic β -cell function. *Vitr Model.* 2022;1(1):41–57.
5. Kalwat MA, Cobb MH. Mechanisms of the amplifying pathway of insulin secretion in the β cell. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2017;179:17–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.05.003>
6. Vakilian M, Tahamtani Y, Ghaedi K. A review on insulin trafficking and exocytosis. *Gene.* 2019;706(January):52–61.
7. Posner BI. Insulin Signalling: The Inside Story. *Can J Diabetes* [Internet]. 2017;41(1):108–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcjd.2016.07.002>
8. Pessin JE, Thurmond DC, Elmendorf JS, Coker KJ, Okada S. Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location! *J Biol Chem* [Internet]. 1999;274(5):2593–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.5.2593>
9. Finan B, Capozzi ME, Campbell JE. Repositioning glucagon action in the physiology and pharmacology of diabetes. *Diabetes.* 2020;69(4):532–41.
10. Simonian HP, Kresge KM, Boden GH, Parkman HP. Differential effects of sham feeding and meal ingestion on ghrelin and pancreatic polypeptide levels: Evidence for vagal efferent stimulation mediating ghrelin release. *Neurogastroenterol Motil.* 2005;17(3):348–54.
11. Gray SM, Page LC, Tong J. Ghrelin regulation of glucose metabolism. *J Neuroendocrinol.* 2019;31(7):0–3.
12. Jenkins SA, Baxter JN, Ellenbogen S, Shields D. Regular Review: Somatostatin. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1987;295(6599):672.
13. Rorsman P, Huising MO. The somatostatin-secreting pancreatic δ -cell in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2018;14(7):404–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41574-018-0020-6>
14. OMS: Organización Mundial de la Salud. Diabetes OMS [Internet]. WHO Media centre. 2017. p. 1. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>
15. Kaul K, Tarr JM, Ahmad SI, Kohner EM, Chibber R. Diabetes: An Old Disease, a New Insight. Chapter 1: Introduction to Diabetes Mellitus [Internet]. Vol. 67, 運輸と経済. 2007. 14–21 p. Available from: www.landesbioscience.com
16. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2019;157:107843. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>

17. Federación Internacional de Diabetes. El Informe Nacional de Estadísticas de la Diabetes, 2020 | Diabetes | CDC [Internet]. Centros de control y prevención de enfermedades CDC. 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/diabetes/spanish/resources/statistics-report.html>
18. Lightfoot YL, Chen J, Mathews CE. Immune-mediated β -cell death in type 1 diabetes: Lessons from human β -cell lines. *Eur J Clin Invest*. 2012;42(11):1244–51.
19. Ahrén B, Pacini G. Insufficient islet compensation to insulin resistance vs. reduced glucose effectiveness in glucose-intolerant mice. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2002;283(4 46-4):738–44.
20. Sun T, Han X. Death versus dedifferentiation: The molecular bases of beta cell mass reduction in type 2 diabetes. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2020;103(December 2019):76–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.12.002>
21. Christensen AA, Gannon M. The Beta Cell in Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep*. 2019;19(9).
22. Talchai C, Xuan S, Lin H V., Sussel L, Accili D. Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure. *Cell*. 2012;150(6):1223–34.
23. Pfeiffer AFH, Klein HH. The treatment of Type 2 Diabetes. *Dtsch Arztebl Int*. 2014;111(5):69–82.
24. Ho J, K.C. Leung A, Rabi D. Hypoglycemic Agents in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2011;5(1):66–73.
25. Gromada J, Chabosseau P, Rutter GA. The α -cell in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2018;14(12):694–704. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41574-018-0097-y>
26. Burcelin R, Knauf C, Cani PD. Pancreatic α -cell dysfunction in diabetes. *Diabetes Metab*. 2008;34(SUPPL. 2):49–55.
27. Thorel F, Népote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, et al. Conversion of adult pancreatic α -cells to B-cells after extreme B-cell loss. *Nature*. 2010;464(7292):1149–54.
28. Guardado Mendoza R, Perego C, Finzi G, La Rosa S, Capella C, Jimenez-Ceja LM, et al. Delta cell death in the islet of Langerhans and the progression from normal glucose tolerance to type 2 diabetes in non-human primates (baboon, *Papio hamadryas*). *Diabetologia*. 2015;58(8):1814–26.
29. Leiter EH, Gapp DA, Eppig JJ, Coleman DL. Ultrastructural and morphometric studies of delta cells in pancreatic islets from C57BL/Ks diabetes mice. *Diabetologia*. 1979;17(5):297–309.
30. Folli F, La Rosa S, Finzi G, Davalli AM, Galli A, Dick EJ, et al. Pancreatic islet of Langerhans' cytoarchitecture and ultrastructure in normal glucose tolerance and in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, Obes Metab*. 2018;20(April):137–44.
31. Karimian N, Qin T, Liang T, Osundiji M, Huang Y, Teich T, et al. Somatostatin receptor type 2 antagonism improves glucagon counterregulation in biobreeding diabetic rats. *Diabetes*. 2013;62(8):2968–77.
32. Yue JTY, Burdett E, Coy DH, Giacca A, Efendic S, Vranic M. Somatostatin

- receptor type 2 antagonism improves glucagon and corticosterone counterregulatory responses to hypoglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 2012;61(1):197–207.
33. Yue JTY, Riddell MC, Burdett E, Coy DH, Efendic S, Vranic M. Amelioration of hypoglycemia via somatostatin receptor type 2 antagonism in recurrently hypoglycemic diabetic rats. *Diabetes*. 2013;62(7):2215–22.
 34. Butler AE, Janson J, Bonner-weir S, Ritzel R, Rizza R a, Butler PC. β -Cell Deficit and Increased β -Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes. *Diabetes* [Internet]. 2003;52(January):102–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12502499>
 35. Deng S, Vatamaniuk M, Huang X, Doliba N, Lian MM, Frank A, et al. Structural and Functional Abnormalities in the Islets Isolated from Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes*. 2004;53(3):624–32.
 36. Gao R, Yang T, Zhang Q. δ -Cells: The Neighborhood Watch in the Islet Community. *Biology (Basel)*. 2021;10(2):1–18.
 37. Adriaenssens AE, Svendsen B, Lam BYH, Yeo GSH, Holst JJ, Reimann F, et al. Transcriptomic profiling of pancreatic alpha, beta and delta cell populations identifies delta cells as a principal target for ghrelin in mouse islets. *Diabetologia* [Internet]. 2016;59(10):2156–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-016-4033-1>
 38. Drury DR, Wick AN, MacKay EM. Effect of Insulin on Glucose- and Arginine-Stimulated Somatostatin Secretion from the Isolated Perfused Rat Pancreas. *Am J Med*. 1951;10(6):763–4.
 39. Honey RN, Fallon MB, Weir GC. Effects of exogenous insulin, glucagon, and somatostatin on islet hormone secretion in the perfused chicken pancreas. *Metabolism*. 1980;29(12):1242–6.
 40. Hauge-Evans AC, Anderson RL, Persaud SJ, Jones PM. Delta cell secretory responses to insulin secretagogues are not mediated indirectly by insulin. *Diabetologia*. 2012;55(7):1995–2004.
 41. Goncalvez Ramírez AC. PAPEL DE LAS CÉLULAS DELTA-PANCREÁTICAS EN EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA DURANTE LA GESTACIÓN. 2021;
 42. Chera S, Baronnier D, Ghila L, Cigliola V, Jensen JN, Gu G, et al. Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic δ -cells into insulin producers. *Nature* [Internet]. 2014;514(7253):503–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13633>
 43. Hull RL, Kodama K, Utzschneider KM, Carr DB, Prigeon RL, Kahn SE. Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: Evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. *Diabetologia*. 2005;48(7):1350–8.
 44. Zhou Q, Melton DA. Pancreas regeneration. *Nature*. 2018;557(7705):351–8.
 45. Saisho Y, Butler AE, Manesso E, Elashoff D, Rizza RA, Butler PC. β -Cell mass and turnover in humans: Effects of obesity and aging. *Diabetes Care*. 2013;36(1):111–7.
 46. Bonner-Weir S, Deery D, Leahy JL, Weir GC. Compensatory growth of pancreatic β -cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes*. 1989;38(1):49–53.