



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

Efecto de la movilización de células progenitoras
hematopoyéticas sobre el daño pancreático inducido
por estreptozotocina en ratones.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

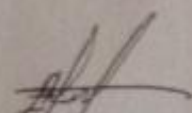
Presentado ante la Ilustre Universidad
Central de Venezuela, por el bachiller
Yonathan Gómez Di Giacinto como
requisito parcial para optar al título de
Licenciado en Biología

Tutores: Dr. José Cardier
Dr. Roschman González

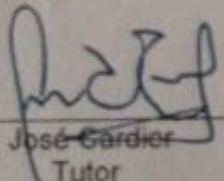
CARACAS, VENEZUELA
MAYO-2014

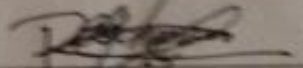
ACTA

Quienes suscribimos, miembros del jurado designado por el Consejo de la Escuela Biología para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Bachiller Yonathan Gómez Di Giacinto, C.I. 20.190.783, titulado "Efecto de la movilización de células progenitoras hematopoyéticas sobre el daño pancreático inducido por estreptozotocina en ratones.", nos hemos reunido hoy, 20 de Mayo de 2014, en la "Sala de usos múltiples" del Instituto de Biología Experimental Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, para atender a la defensa pública de su trabajo, después de lo cual consideramos que amerita la calificación de Veinte (20) puntos. Certificamos así que este Trabajo Especial de Grado cumple con los requisitos exigidos por la Universidad Central de Venezuela para optar al título de Licenciado en Biología.


Dra. Elizabeth Merentes
Jurado


Dr. Hector Finol
Jurado


Dr. Jose Gardier
Tutor


Dr. Roschman Gonzalez
Co-tutor

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que contribuyeron de formas muy distintas en mi formación y en la realización de este proyecto:

-Le agradezco profundamente a mis padres y nonnos por el apoyo en todos los sentidos para cumplir mis metas y seguir en este camino.

-A mi hermano Yovany, por influenciar de forma importante en la escogencia de esta carrera.

-A mi hermano Yony, por sus invaluable consejos y ayudas a lo largo de esta importante etapa.

-A Heimary, por todo su cariño, amor y apoyo, tan importantes en el largo proceso que significó este trabajo.

-Al Profesor Ángel Obregón, por las innumerables horas de consulta académica desinteresada que me permitieron ingresar a estudiar en esta hermosa casa de estudios.

-A la Profesora Palmira, por aceptarme desde muy temprano en su laboratorio, lo que influyó de forma importante en mi formación.

-A mi Tutor José Cardier, por abrirme las puertas del laboratorio y confiar en mí lo suficiente para emprender este proyecto desde cero, permitiéndome así trabajar en este apasionante campo por el cual decidí estudiar biología. De igual forma, por seguir contribuyendo en mi formación más allá de una tutoría de tesis y por propiciar un ambiente de trabajo en el laboratorio que me hizo sentir en familia.

- A la Dra. Dilana, por contribuir de forma importante en mi formación práctica en el laboratorio.

-A la Dra. Olga, por estar siempre dispuesta a prestar su ayuda en todo momento.

-Al Dr. Carlos, por su disposición a responder consultas, pero en especial por esas conversaciones en la cocina al preguntarme ¿cómo va el proyecto?

- A Ingrid y Mayela, por su ayuda en tantos sentidos desde que entré al laboratorio.

-A la Sra. Margot por estar siempre dispuesta a ayudarme con una sonrisa contagiosa.

-Al Profesor Roschman, por sus asesorías y amistad desde que me dió clases por primera vez hasta el término de este trabajo.

- A la Dra. Teresa, cuyo aporte al trabajo en el campo del análisis patológico fue invaluable.

- A “mis hermanos” del laboratorio (Alejandro, Ricardo, Marianny, Leslie, Ligia y Gisell) por todos esos momentos divertidos que pasamos juntos, tanto dentro como fuera del laboratorio.

- A todos aquellos excelentes Profesores que tuve desde el principio de la carrera, los cuales me hicieron estar orgulloso de mi facultad de ciencias.

-A mi universidad “la UCV” por darme la oportunidad de ser, quien quiero ser.

RESUMEN

La diabetes tipo 1 (DT1) es una enfermedad del tipo autoinmune, cuyo blanco son las células β pancreáticas. Actualmente la administración de insulina constituye el único tratamiento aceptado. El trasplante de células madre (CM) ha sido postulado como una posible alternativa para regenerar el páncreas de pacientes diabéticos. En el presente trabajo evaluamos la hipótesis de que la movilización de células madre hematopoyéticas (CMH), inducida por AMD3100, G-CSF, y/o la combinación de ambos favorece la regeneración pancreática en un modelo de daño inducido por estreptozotocina (STZ). Ratones C57BL/6 fueron inyectados con STZ (175 mg/kg) o vehículo y una vez establecida la diabetes se los dividió en 4 grupos: 1) Diabéticos (STZ); 2) Diabéticos tratados con una dosis diaria de 250 μ g/kg de G-CSF durante 5 días; 3) Diabéticos tratados con una dosis de 5 mg/kg de AMD3100; 4) Diabéticos tratados con G-CSF + AMD3100. Diariamente se evaluó glicemia en ayuno, insulina y al final del protocolo se extrajo el páncreas de los animales de cada grupo experimental para análisis histológico e inmunohistoquímico. La movilización de CMH, inducida por G-CSF y/o AMD3100, no mejoró la hiperglicemia ni los bajos niveles de insulina observados en los animales diabéticos. El tratamiento con STZ indujo una significativa reducción en el número y tamaño de los islotes de Langerhans (IL), comparados con ratones sanos. Los ratones diabéticos tratados con G-CSF y/o AMD3100 presentaron IL con características similares en tamaño y celularidad endocrina total, a los ratones sanos. En todos los grupos experimentales se observó una disminución significativa en el número de células beta de los IL. Estos resultados indican que la movilización de CMH induce un efecto protector o regenerativo de los IL en ratones con diabetes inducida por STZ. Sin embargo este efecto no mejora la regeneración de células beta en estos animales.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Trasplantes de células derivadas de médula ósea en diabetes murina y humana.....	4
2.2. Tipos celulares movilizados por G-CSF y AMD3100	7
2.3. Efectos de la movilización de CMH en el modelo experimental de diabetes inducida por STZ.....	8
3. OBJETIVOS	10
3.1. Objetivo general.....	10
3.2. Objetivos específicos	10
4. HIPÓTESIS	10
5. MATERIALES Y MÉTODOS	11
5.1. Grupo experimental	11
5.2. Inducción de diabetes	11
5.3. Inducción de la movilización de CMH mediante el tratamiento con G-CSF y AMD3100	12
5.4. Determinación de glicemia.....	12
5.5. Determinación de leucocitos en sangre periférica	13
5.6. Detección de insulina.....	13
5.7. Histología.....	15
5.8. Inmunomarcaje de insulina	17
5.9. Análisis morfométrico.....	18
5.10. Análisis de resultados	19
6. RESULTADOS	20
6.1. Estandarización del modelo de daño pancreático con STZ	20

6.2. Efecto de la administración de G-CSF y AMD3100 sobre la movilización de leucocitos en ratones diabéticos por STZ	22
6.3. Efecto de los agentes movilizadores de CMH G-CSF y AMD3100 sobre la diabetes inducida en ratones por STZ	23
6.4. Estudios inmunohistoquímico para la detección de células beta en páncreas de ratones diabéticos tratados con G-CSF y AMD3100	26
7. DISCUSIÓN	29
8. CONCLUSIONES.....	33
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

BFU-E: Serie eritroide

CM: Célula madre

CME: Célula madre embrionaria

CMH: Célula madre hematopoyética

CMM: Célula madre mesenquimal

CMMO: Células mononucleares de médula ósea

CPE: Célula progenitora endotelial

CPH: Células progenitoras hematopoyéticas

DT1: Diabetes tipo 1

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos

GEMM: Serie granulocítica, eritroide, macrofágica y megacariocítica

G-M: Serie granulocítica y macrofágica

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

H/E: Tinción hematoxilina eosina

IL: Islote de Langerhans

MO: Médula ósea

NOD: Ratón no obeso diabético

PBS: Búfer fosfato salino

SDF-1/CXCL12: Factor derivado del estroma-1

STZ: Estreptozotocina

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes constituye un grupo de enfermedades metabólicas que tienen en común la hiperglicemia y que ocurre como consecuencia de un déficit en la secreción de insulina, un defecto en su actividad metabólica o ambos (A.D.A, 2012). Existen dos tipos principales de diabetes: la tipo 1 (anteriormente denominada insulín dependiente o diabetes juvenil), la cual resulta de una destrucción de las células β del páncreas, producto de una enfermedad autoinmune (A.D.A, 2012). Este tipo de diabetes corresponde al 5-10 % del total de diabéticos en el mundo. La tipo 2 (previamente definida como no insulín dependiente) que afecta entre un 90 y 95% del total de los diabéticos en el mundo. Este tipo de diabetes abarca pacientes con resistencia a la insulina y frecuentemente algún grado de deficiencia en la producción de ésta (A.D.A, 2012).

Experimentalmente, el modelo de diabetes animal más ampliamente utilizado es la inducción química con estreptozotocina (STZ). Este modelo fue reportado por Rakietyen y colaboradores en 1963, y constituye la manera experimental más rápida y económica para inducir diabetes. La STZ, es un derivado nitroso unido al carbono 2 de una hexosa (Lenzen, 2008), (Figura 1). Originalmente se obtuvo de *Streptomyces achromogenes* (Herr y col., 1960). El mecanismo de acción de la STZ, para la inducción de diabetes, está basado en que este compuesto se incorpora a las células β pancreáticas a través del transportador de glucosa GLUT2 (Schneidl y col., 1994; Elsner y col., 2000) y posteriormente transfiere grupos metilo a nivel de las purinas, lo cual resulta en daño del ADN (Bennett y Pegg., 1981), con la consecuente muerte de células β y deficiencia en la producción de insulina (Lenzen, 2008). Basándose en que tanto la diabetes tipo 1 como la inducida por STZ resulta de un daño pancreático de las células β , numerosos investigadores han planteado la posibilidad de regenerar este órgano mediante el uso de células madre (CM).

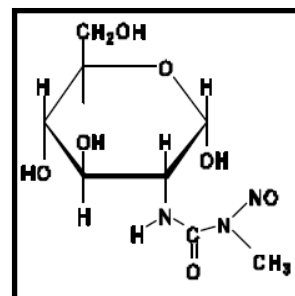


Figura 1. Estructura química de la molécula de STZ. Extraído de sigma-aldrich product No. S0130

Las CM se definen funcionalmente como células con capacidad de proliferación ilimitada, auto renovación y de diferenciación hacia todos los tipos celulares del organismo (Weissman, 2000; Weissman y col., 2001; Verfaillie y col., 2002). Las CM han sido clasificadas según su origen como: 1) CM Embrionarias (CME), las cuales derivan de la masa celular interna del blastocisto en mamíferos y son pluripotentes, es decir, tienen capacidad de autorenovación, proliferación ilimitada y pueden diferenciarse a todos los tipos celulares provenientes de las tres capas embrionarias. Sin embargo no son capaces de generar un organismo completo. 2) CM adultas, se hallan en diversos tejidos del organismo de mamíferos adultos y son multipotentes, es decir, generan múltiples tipos celulares y tienen menor capacidad de auto renovación (Verfaillie y col., 2002; Lanza y col., 2006).

Un tipo de CM adultas son las CM hematopoyéticas (CMH), las cuales dan origen a todas las células sanguíneas mediante el proceso de hematopoyesis, que ocurre en la médula ósea (MO) del humano adulto (Abbas y col., 2002). Estas son las CM más estudiadas y de las cuales se cuenta con un gran conocimiento de su biología y funcionalidad. Till y McCulloch fueron los primeros en reportar en 1961, la presencia de CMH como una población clonogénica de médula ósea que generó colonias mieloeritroides en el bazo de animales letalmente irradiados (Till y McCulloch., 1961).

En el humano adulto y bajo condiciones normales, la mayoría de las CMH residen en la MO (Abbas y col., 2002), y solo alrededor de 0,01% se encuentran circulantes, (Palis, 2008); sin embargo, bajo ciertas condiciones patológicas o por efecto de ciertas citoquinas (G-CSF, GM-CSF) (Lavazais y col., 2007), estas células pueden migrar del nicho hematopoyético hacia el torrente sanguíneo. Es bien conocido que la administración del factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF, por sus siglas en inglés) en humanos induce la movilización de CMH hacia la circulación de donde pueden ser colectadas para ser usadas como trasplante autólogo de médula ósea (Abkowitz y col., 2003). Así mismo, esta citoquina, induce la movilización de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y células dendríticas. El mecanismo mediante el cual el G-CSF induce la movilización de CMH y de células sanguíneas, es mediante la estimulación en la proliferación de neutrófilos.

Esto aumenta la liberación de metaloproteasas que disminuyen la concentración de la quimiocina, factor derivado de células estromales (SDF-1, también conocido como CXCL12) a nivel medular, lo cual disminuye el anclaje de las CMH al estroma, con lo que se favorece la movilización de estas células al torrente sanguíneo (Kaushanky, 2006). Recientemente, se ha reportado el compuesto AMD3100 como un agente movilizador de CMH, y su uso en humanos ha sido aprobado por la FDA. Este bcl-2 inhibidor de origen sintético, tiene como mecanismo de acción principal, la inhibición potente, selectiva y reversible de la interacción entre SDF-1/CXCL12 con su receptor la quimiocina CXCR4, lo cual es fundamental para el anclaje de las CMH y las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) en la médula ósea. El uso de este compuesto se ha planteado como terapia única o en combinación con G-CSF (Pusic y Di Persio, 2010) para inducir la movilización de CMH.

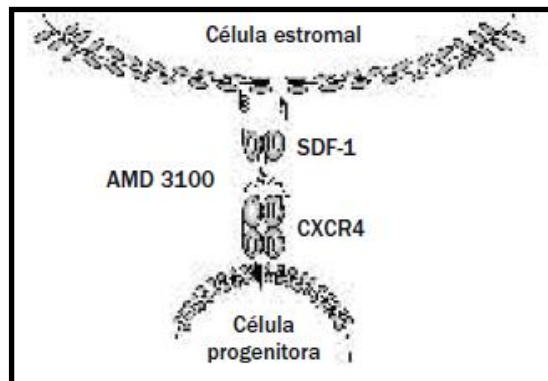


Figura 2: Mecanismo de acción de AMD3100 en la movilización de CPH y CMH de la MO. Extraído de Alegre., 2008.

A nivel pancreático, se ha sugerido la presencia de células progenitoras capaces de diferenciarse a diferentes tipos de células pancreáticas, en los ductos del órgano adulto (Bonner y col., 2000; Bonner y Weir., 2005; Reichert y Rustgi., 2011). Sin embargo, la existencia de estas células aún es controversial (Dor y col., 2004). Mediante técnicas de rastreo génico (*lineage tracing*), en ratones transgénicos sometidos a pancreatectomías o ligamiento parcial de los ductos pancreáticos, se ha demostrado la presencia de células positivas para marcadores genéticos como Ng3, los cuales se pensaba solo estaban presentes en estadios muy primitivos en el desarrollo del páncreas endocrino (Xiabo y col., 2008). Se ha reportado que estas células, localizadas únicamente a nivel de la región dañada del páncreas, tienen la capacidad de generar islotes funcionales *in vitro* (Xiabo y col., 2008). Basado en estos resultados, los autores postularon la posibilidad de desarrollar terapias alternativas que puedan estimular la proliferación y diferenciación de estos progenitores a nivel pancreático en pacientes con deficiencia de insulina.

2. ANTECEDENTES

2.1. Trasplantes de células derivadas de médula ósea en diabetes mûrida y humana

Un dogma tradicional en el campo de la biología regenerativa era la afirmación de que las células madre estaban irreversiblemente comprometidas con los órganos a los que danban origen. Sin embargo, esto se demostró no ser totalmente cierto, ya que en modelos animales se evidenció que CMH podían participar en procesos regenerativos en tejido nervioso (Eglitis y Mezey., 1997;Mezey y col., 2000), músculo esquelético (Gussoni y col., 1999), hígado (Lagasse y col., 2000; Theise y col., 2000) y músculo cardíaco (Orlic y col., 2001).

En 1985 Ikehara y colaboradores reportaron que el transplante alogénico de MO en conjunto con terapia mielosupresiva previno el desarrollo de hiperglicemia en ratones NOD, los cuales están predispuestos genéticamente a desarrollar diabetes tipo I. A pesar de que estudios posteriores confirmaron estos hallazgos (La Face y Peck., 1989; Li y col., 1996), no es sino hasta el 2003, cuando gracias al avance en las técnicas de obtención y purificación de células de la MO, se pudo trasplantar CMH alogénicas a ratones NOD mielosuprimidos, lo cual resultó en el bloqueo de la respuesta autoinmune durante seis meses (Beilhack y col., 2003). En el mismo orden de ideas Kang y colaboradores (2005) evaluaron el efecto del trasplante de CMH en ratones NOD, pero con la diferencia que lo hicieron no solo antes del inicio de la enfermedad, sino también en etapas tempranas y tardías del desarrollo de la diabetes. En el primer grupo (antes del inicio de la enfermedad) evaluaron varias condiciones mielosupresivas, como dosis de radiación, anticuerpos inmunosupresores y ambos. Seguidamente, les suministraron $3,0 \times 10^7$ células mononucleares de médula ósea (CMMO).De este grupo solo los ratones que fueron irradiados y recibieron anticuerpos anti-CD3 lograron el 100% de prevención de la enfermedad durante el año de estudio, a diferencia del control (solo condicionamiento) y del resto de las condiciones evaluadas, donde todos los animales desarrollaron la enfermedad. En los otros dos grupos usando de igual forma el condicionamiento combinado, solo 1/45 ratones logró revertir la

hiperglicemia con el suministro de CMMO. También evaluaron el trasplante de MO sin fraccionar y CMMO obtenidas de sangre periférica mediante movilización con G-CSF, sin embargo, no hubo reversión de hiperglicemia en ningún caso. Con base en esto, los autores concluyen que no hay una contribución significativa de las CMH en la reversión de la diabetes autoinmune una vez establecida.

Basados en los resultados anteriores, Voltarelli y colaboradores (2007) llevaron a cabo un ensayo clínico en 15 pacientes (14-31 años) con no más de 6 semanas de haber sido diagnosticadas con DT1. Este protocolo clínico se basó en el suministro de altas dosis de inmunosupresión (Ciclofosfamida 50 mg/kg/día y globulina antitímocítica de conejo 0,5 mg/kg/día) durante los 5 días previos al trasplante autólogo de 11×10^6 células CD34⁺/kg. Estas células fueron aisladas de sangre periférica de los pacientes luego del tratamiento con G-CSF (10 µg/Kg/día) y Ciclofosfamida (2 g/m²). En el estudio se evaluó los niveles diarios de glicemia, péptido-C durante la prueba de tolerancia de alimentos mixtos, hemoglobina glicosilada (A_{1c}) cada 3 meses y presencia de autoanticuerpos contra la descarboxilasa de ácido glutámico a diferentes momentos post-trasplante. Los autores de este trabajo reportaron que el 93% de los pacientes experimentó períodos de independencia de insulina exógena de entre 7 y 36 meses con aumento en los niveles de péptido-C, disminución en los de hemoglobina A_{1c} y de autoanticuerpos contra la descarboxilasa de ácido glutámico. Aunque los niveles de este último fueron bajos, no llegaron a ser cero, indicando que el régimen inmunosupresivo no fue suficiente para eliminar la respuesta inmunitaria contra las células β. Los autores atribuyen los resultados a tres causas posibles, regeneración de las células β a partir de otras preexistentes, neogénesis del páncreas a partir de células madre pancreáticas o a partir de las CMH trasplantadas. Además, afirman que los resultados no pueden atribuírsele solo al régimen de inmunosupresión, puesto que en estudios realizados por otros autores donde solo se suministró inmunosupresores durante largo tiempo a pacientes con DT1 (≤12 meses), la mejoría en las concentraciones de péptido C solo aumentan transitoriamente y posteriormente decaen, a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, donde el régimen de inmunosupresión se limitó a 5 días previos al trasplante de CMH y la mejoría en las concentraciones de péptido C se mantuvieron hasta por 2 años en algunos pacientes. Posteriormente Couri y colaboradores en 2009

publicaron una ampliación del estudio descrito anteriormente pero con más pacientes y mayor tiempo de seguimiento. Al igual que en el trabajo anterior, la mayoría de los pacientes mostraron largos períodos de independencia de insulina y diferencias significativas en la concentración de péptido C antes y después del trasplante. Sin embargo, los efectos secundarios producto del intenso régimen de inmunosupresión estuvieron presentes en ambos estudios.

Experimentos realizados por Ezquer y colaboradores (2008) evaluaron si la administración de células madre mesenquimales (CMM) derivadas de MO podrían contribuir a la restitución de la función endocrina del páncreas y la de los riñones, en ratones C57BL/6 machos inyectados con STZ (40 mg/kg durante 5 días consecutivos). La consideración de estos animales como diabéticos fue que el nivel de glucosa (sin estar en ayuno) fuera mayor o igual a 250 mg/dl durante 3 días seguidos. Las variables a evaluar fueron, glucosa sanguínea, prueba de tolerancia a la glucosa, histología de páncreas (tinción H/E e insulina/glucagón) y la función renal mediante la presencia de glucosuria, y albuminuria. Veinticinco días después de haber recibido la primera dosis de STZ, se le inyectó 25×10^6 CMM/kg (aprox. 5×10^5 CMM/ratón) en la vena de la cola a cada ratón. Luego de una semana los niveles de glicemia y glucosuria disminuyeron progresivamente hasta llegar a niveles casi normales a un mes después de la inyección con CMM, a diferencia de los controles donde el aumento de ambos fue progresivo. El análisis nefrológico arrojó de igual forma resultados concordantes, donde la albuminuria se redujo solo en los ratones tratados al igual que se conservó la estructura glomerular. En los no tratados se observó lesiones características de DT1 sin control glicémico, como hialinosis glomerular y expansión mesangial. En cuanto al análisis histológico e inmunohistoquímico de los islotes pancreáticos, los ratones tratados presentaron una estructura y organización de los tipos celulares que conforman el islotes muy similar a los no diabéticos (mayor cantidad de células β que α), aunque más pequeños y en menor número, a diferencia de los no tratados donde la estructura y tamaño se observó totalmente alterada. A pesar de esto, las pruebas de tolerancia a la glucosa no fueron significativamente distintas entre los tratados y los no tratados con CMM. Los autores de este trabajo sugirieron que una segunda dosis de CMM podría resultar en mejorías importantes en estos animales y que el mecanismo de regeneración pudiera estar relacionado con una diferenciación de las CMM en

células productoras de insulina o que la presencia de éstas en el páncreas y riñón (demostrada con marcaje) puede producir proliferación/diferenciación de progenitores endógenos.

De manera similar a lo descrito anteriormente, Rackham y colaboradores (2011) administraron CMM derivadas de riñón ($2,5 \times 10^5$ CMM /ratón) conjuntamente con el trasplante de islotes singénicos a ratones C57BL/6 con diabetes inducida con STZ (180 mg/kg). Estos reportaron que un 92% de los ratones que recibieron tanto CMM como islotes revirtieron la hiperglicemia a niveles normales, comparado con un 42% de los que solo recibieron islotes, durante los 30 días de estudio. Estos autores también reportaron que el contenido hormonal de los islotes no estaba alterado y que la morfología y vascularización en términos de la distribución de las células en los islotes era muy similar a ratones normales. Atribuyen este resultado a la capacidad de las CMM de secretar factores que inducen angiogénesis y promueven la migración de células endoteliales hacia los islotes. Concluyen que la administración conjunta de CMM e islotes singénicos ofrece mejores resultados en la reversión de la hiperglicemia que solo el trasplante de islotes. Sin embargo, al igual que lo reportado por Ezquer y colaboradores (2008) no hubo mejoría en la respuesta a las pruebas de tolerancia de glucosa, indicando que la presencia de las CMM ayuda en la reversión de hiperglicemia pero no a la capacidad de las células β de responder ante grandes cantidades de glucosa. Los autores reportan que la administración de CMM derivadas de riñón (sin trasplante de islotes) no fue suficiente para revertir la hiperglicemia en su modelo.

2.2. Tipos celulares movilizados por G-CSF y AMD3100

Aún cuando las terapias basadas en el trasplante de CM parecen ser prometedoras, todavía existen muchos problemas a superar para su aplicación, como el cultivo, aislamiento, expansión “*ex vivo*” entre otras. Una alternativa para el uso de terapias basadas en CM, es estimular la movilización de CM hematopoyéticas (CMH) desde la médula ósea hacia el torrente sanguíneo, con lo cual se evitaría los problemas asociados a la toma de muestra mediante punción medular. Este enfoque se soporta en el hecho de que en clínica humana existe una

amplia experiencia en la movilización de CMH para trasplantes de MO mediante la administración de la citoquina G-CSF (Cashen y col., 2004).

Recientemente ha sido aprobado, por la agencia de drogas y alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, el compuesto AMD3100 el cual induce la movilización de CMH. Broxmeyer y colaboradores (2005), reportaron que el AMD3100 por si solo o en combinación con G-CSF tenía la capacidad de movilizar CMH en humanos y ratón. Estos estudios permitieron determinar, en la cepa de ratón C3H/HeJ, que el pico de máxima movilización de CMH ocurría luego de una hora, posterior a la inyección de AMD3100 por vía subcutánea (5 mg/Kg). La administración de múltiples dosis (5 mg/kg, tres días consecutivos) de AMD3100 no inducía diferencias significativas en la movilización de CMH con respecto a animales que recibieron una o dos dosis del compuesto. Sin embargo, la administración conjunta de AMD3100 y G-CSF resultó en un efecto sinérgico en la movilización de CMH. Pitchford y colaboradores (2009) siguiendo el mismo protocolo que Broxmeyer y colaboradores (2005), confirmaron la mayor efectividad del G-CSF sobre el AMD3100 en cuanto a la capacidad de movilización de CMH, y que la combinación de ambos moviliza mayor cantidad que cada uno por separado. Adicionalmente, estos autores demostraron que AMD3100 por sí solo, moviliza mayor cantidad de células progenitoras endoteliales (CPE), en comparación con G-CSF o con el tratamiento combinado de ambos agentes. Estos progenitores son de gran importancia en medicina regenerativa por la capacidad de generar angiogénesis.

2.3. Efectos de la movilización de CMH en el modelo experimental de diabetes inducida por STZ.

Pocos son los estudios realizados para evaluar el efecto del trasplante o de movilización de CMH sobre la diabetes inducida por STZ. Es de destacar el estudio realizado por Lavazais y colaboradores (2007) en el cual evaluaron la posibilidad de transdiferenciación “*in vivo*” de células de médula ósea hacia células beta productoras de insulina. En este estudio, los autores realizaron trasplante de células de médula ósea y la posterior movilización de CMH, mediante la administración de

G-CSF, en ratones con diabetes inducida por STZ. Para esto usaron un sistema que les permitía rastrear si las células de MO del donante se transdiferenciaban una vez implantadas en el receptor a células productoras de insulina. Los autores reportaron que en este modelo experimental no solo no hubo evidencias de transdiferenciación, sino que no hubo mejoría en los niveles de glicemia de estos animales. Por otro lado, para el momento de la escritura de este trabajo de investigación, no tenemos conocimiento de ningún reporte en el que se haya evaluado el efecto de la administración de AMD3100 por sí solo o en combinación con G-CSF en un modelo de diabetes inducida con STZ en ratón.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar el posible efecto de la administración de AMD3100 y/o G-CSF en la regeneración pancreática de ratones con diabetes inducida con STZ.

3.2. Objetivos específicos

1. Estandarizar el modelo de diabetes inducida por STZ en ratones C57BL/6.
2. Optimizar un protocolo de movilización de CMH con G-CSF y AMD3100.
3. Monitorear el efecto de G-CSF y AMD3100 sobre los niveles de glicemia e insulina en ratones C57BL/6 con diabetes inducida por STZ.
4. Evaluar a nivel histológico e histoquímico el tejido pancreático de cada grupo de experimentación.

4. HIPÓTESIS

Si la movilización de progenitores inducida por AMD3100, G-CSF o la combinación de ambos, favorece la regeneración pancreática en un modelo de daño inducido por STZ, entonces se debería observar un restablecimiento de la estructura y función de los IL luego de la administración de los tratamientos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Grupo experimental

Para la realización de este trabajo se emplearon ratones de la cepa C57BL/6, machos, de 8-12 semanas entre 23 y 25 g de peso corporal, provenientes del bioterio central del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

5.2. Inducción de diabetes

A pesar de que el modelo de diabetes inducido por STZ es el más utilizado experimentalmente, tanto para estudiar algunos de los factores que intervienen en la patología de la diabetes como en sus complicaciones, la respuesta a este compuesto en el modelo murino es muy variable debido a: 1) la cepa de ratón escogida; 2) el género; 3) el empleo de dosis únicas o múltiples y 4) la preparación de la STZ (Deeds y col., 2011). Por ello se consideró que la dosis seleccionada para evaluar el modelo de diabetes debía cumplir con los siguientes requerimientos: 1) aumento de glicemia a las 48 o 72h de haber administrado el compuesto y que esta se mantuviera en el tiempo; 2) permitir la supervivencia de los ratones por un período entre una a dos semanas y 3) disminución significativa del número y tamaño de los islotes de Langerhans.

En el presente trabajo se indujo diabetes en ratones C57BL/6 mediante una inyección intraperitoneal (i.p) de STZ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Esta fue preparada media hora antes de su uso, bajo condiciones de asepsia en buffer citrato fresco 0,1 M y pH 4,5 (Rakieten y col., 1963). Las dosis probadas fueron 200, 120, 150 y 175 mg/kg. Finalmente se escogió la dosis de 175 mg/kg para los protocolos experimentales. Los animales fueron considerados diabéticos cuando la glicemia fue mayor o igual a 220 mg/dl con 6 horas de ayuno durante 48 h consecutivas. Estos permanecieron en el bioterio del IVIC donde fueron dispuestos en jaulas *ad hoc*, provistas de agua y alimento. Se permitió que los roedores comieran y bebieran *ad libitum*, exceptuando el período de ayuno.

5.3. Inducción de la movilización de CMH mediante el tratamiento con G-CSF y AMD3100

Para estudiar el efecto de la movilización de CMH en ratones diabéticos, se usaron tres metodologías distintas: Una dosis de 5 mg/kg de AMD3100 (Broxmeyer y col., 2005; Yangguang y col., 2007) (Figura 3-C), una dosis diaria durante cinco días de 250 μ g/kg de G-CSF (Lavasaiz y col., 2007) (Figura 3-D), y por último la combinación de ambos protocolos; donde el AMD3100 se suministró junto con la ultima dosis de G-CSF (Figura 3-E). Esto debido a que ha sido reportado que la administración conjunta de AMD3100 y G-CSF provoca una movilización de CMH mucho mayor que los protocolos por separado (Broxmeyer y col., 2005). Las inyecciones fueron subcutáneas usando como vehículo solución salina.

5.4. Determinación de glicemia

Se evaluó diariamente la glicemia en cada uno de los grupos experimentales y control mediante el uso de un glucómetro (Optium Xceed, USA). Para lo cual se extrajo una gota de sangre mediante un pequeño corte en la cola de cada uno de los ratones, los cuales se mantuvieron en ayuno por seis horas antes de la realización de cada determinación.

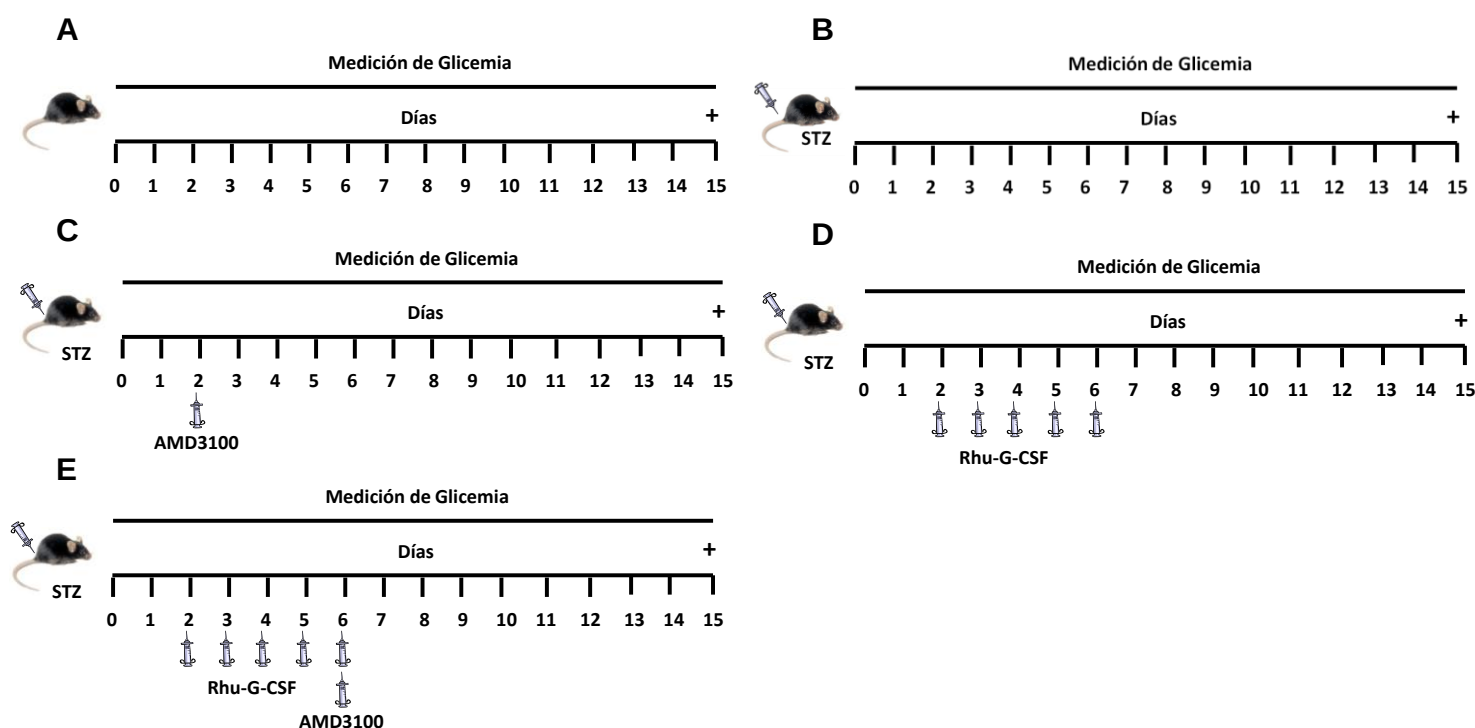


Figura 3: Diseño experimental. Ratones C57BL/6 machos, inyectados con STZ i.p (día 0) y sometidos a distintos regímenes de inyección de movilizadores. **A.** Ratones control, sin intervención. **B.** Ratones STZ i.p. **C.** Inyección única de AMD3100 s.c dosis 5 mg/kg (día 2). **D.** Inyecciones diarias de G-CSF dosis 250 µg/kg (días 2-6). **E.** Inyecciones diarias de G-CSF s.c dosis 250 µg/kg (día 2-6) en combinación con una inyección de AMD3100 s.c dosis 5 mg/kg (día 6). +: Sacrificio en cámara de CO₂ para extracción de páncreas.

5.5. Determinación de leucocitos en sangre periférica

Para determinar si se produjo movilización de progenitores hematopoyéticos, se determinó antes y después de la administración de los agentes movilizadores la cantidad de leucocitos/µl en cada ratón. A todos los grupos se le determinó el conteo de leucocitos al momento que fueron considerados diabéticos. En el grupo de AMD3100 se extrajo sangre 2h después de inyectar el agente. Tanto en el grupo que se le suministró G-CSF como en el de G-CSF+AMD3100 se les extrajo el día 7 (24h después de la última inyección). Por último al grupo de STZ se les inyectó el vehículo de los agentes (solución salina) y se extrajo sangre según los protocolos anteriores. En cada caso se extrajeron 2 µl de sangre mediante un pequeño corte en la cola y se agregó en solución Turk para una dilución final de 1/20. Se contó en cámara de Neubauer y se calculó con la siguiente fórmula: Leucocitos/µl= Promedio*10*20

5.6. Detección de insulina

Con el fin de determinar la concentración de insulina producida por cada animal de experimentación (como una medida indirecta del estado de las células β) se utilizó el ensayo de Elisa específico para la detección de esta hormona en modelos murinos (Millipore, Rat/Mouse Insulin ELISA kit-Billerica, Massachusetts). Se les extrajo sangre de la cola los días 0-2-6-11-14 mediante tubos de microhematocrito heparinizados. Posteriormente se centrifugaron durante 6 minutos para separar el plasma, el cual fue almacenado a -20 °C hasta que se recolectaron todas las muestras de sangre de cada ratón. El ensayo se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante:

1. Se lavó 3 veces cada pocillo de la placa con 300 µl de tampón de lavado (dilución 1:10, Tris buffer, Tween 20 y agua desionizada)
2. Se agregaron 10 µl de Tampón de ensayo (0,05 M de buffer fosfo-salino, pH 7,4, 0,025 M EDTA, 0,08% de azida de sodio y 1% BSA) a los pocillos de los blancos y a los de las muestras.
3. Se agregaron 10 µl de plasma de ratón a los pocillos de los blancos, a los de la curva de calibración y a los de control de calidad.
4. Se agregaron 10 µl (en orden ascendente) de las concentraciones conocidas de insulina de rata para realizar la curva de calibración en los pocillos dispuesto para tal fin.
5. Se agregaron 10 µl de solución de control de calidad (insulina de rata en buffer de control) a los 4 pocillos destinados para tal fin.
6. Se agregaron 10 µl de cada una de las muestras obtenidas de cada ratón.
7. Se agregaron 80 µl del anticuerpo de detección a todos los pocillos.
8. Se incubó a temperatura ambiente durante dos horas en un agitador de placas
9. Se removieron las soluciones de todos los pocillos.
10. Se lavó 3 veces cada pocillo de la placa con 300 µl de tampón de lavado.
11. Se agregaron 100 µl de solución enzimática (estreptavidina-peroxidasa de rábano en solución buffer) a cada pocillo. Luego se incubó a temperatura ambiente en un agitador de placas durante 30 minutos.
12. Se removieron las soluciones de todos los pocillos.
13. Se lavó 6 veces cada pocillo de la placa con 300 µl de tampón de lavado.
14. Se agregaron 100 µl de solución TMB a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos en un agitador de placas
15. Se agregaron 100 µl de solución de parada (0,3M de HCl) y se agitó la placa manualmente.

16. En un lector de placas de *ELISA* se leyó la absorbancia a 450 nm.

5.7. Histología

Con el fin de poder comparar la organización, estructura y tamaño de los IL del tejido pancreático de cada animal de experimentación y sus respectivos controles, se tiñeron los cortes del órgano de dos maneras: 1) con H/E, lo que permitió una visión general del estado de los islotes, y 2) mediante técnicas de IH, usando anticuerpos anti-insulina, lo que nos permitió conocer la proporción del islote que tiene células β . Para ambos procedimientos se extrajo el páncreas, se fijó en formalina 10%, fue incluido en parafina y se procedió a realizar cortes de 4 μ m. A continuación se explica cada uno de estos pasos:

Extracción del páncreas

Al final de cada experimento, se sacrificaron los animales en cámara de CO₂, fueron introducidos en un vaso de precipitado con alcohol y bajo campana de flujo laminar se extrajo la totalidad del páncreas, el cual se colocó durante unos minutos en una placa con solución salina isotónica (8,5 g/l NaCl), con el fin de retirar el exceso de sangre y que ésta no interfiriera en la fijación posterior.

Fijación

Luego de que el exceso de sangre fue retirado, se introdujo el órgano en una solución de formalina tamponada al 10% hasta el momento de su procesamiento.

Deshidratación I

Se utilizó etanol como agente deshidratante, siguiendo el protocolo:

Etanol al 50%: 1 cambio (15 minutos)

Etanol al 80%: 1 cambio (15 minutos)

Etanol al 95%: 1 cambio (15 minutos)

Etanol al 100%: 2 cambios (15 minutos/cambio)

Desalcolización I

Se utilizó xileno como agente desalcoholizante, siguiendo el protocolo:

Xileno I: 1 cambio (15 minutos)

Xileno II: 1 cambio (20 minutos)

Inclusión

Antes de la inclusión, se efectuaron 3 cambios de la resina de 30 minutos cada uno, a la temperatura de fusión de la misma (60°C) dentro de una estufa. Transcurrido el tiempo se tomó el órgano con pinzas y se realizó el molde de parafina.

Cortes

Los cortes gruesos de 4 µm fueron obtenidos con un micrótopo y dispuestos en portaobjetos.

Desparafinación

Fueron introducidos en la estufa a 60°C durante 30 minutos para fusionar la parafina y ésta pudiera ser posteriormente removida con xileno en dos cambios de 10 minutos cada uno.

Tinción Hematoxilina-Eosina

Rehidratación

La rehidratación ascendente se realizó siguiendo el procedimiento:

Etanol al 100%: 1 cambio (2 minutos)

Etanol al 95%: 1 cambio (2 minutos)

Etanol al 80%: 1 cambio (2 minutos)

Etanol al 50%: 1 cambio (2 minutos)

Agua corriente: 1 cambio (2 minutos)

Tinción Hematoxilina de Mayer-Eosina Y

Se introdujeron las láminas durante 10 minutos en la hematoxilina de Mayer, luego se lavaron con agua corriente y se pasaron a la eosina Y al 1% durante 1 minuto.

Deshidratación y Desalcolización II

Una vez que se logró la intensidad deseada en ambos colorantes, se debió proceder al montaje para lo cual fue necesario deshidratar y desalcoholizar de nuevo las muestras. Siguiendo los protocolos descritos arriba, con la diferencia que fueron cambios de 1 minuto cada uno.

Montaje

Se utilizó el medio de adhesión DPX en cubreobjetos, los cuales fueron pegados sobre la muestra.

5.8. Inmunomarcaje de insulina

Para este marcaje se utilizó un estuche comercial marca Dako (*Guinea pig anti-Insulin*), después de la desparafinación (ver arriba) se siguió el siguiente procedimiento:

1. Se lavaron los cortes 3 veces con agua destilada durante dos minutos por vez.
2. Se llevó hasta ebullición buffer citrato en un vaso de precipitados y se introdujeron los portaobjetos durante 15 minutos. Luego se dejaron enfriar por el mismo tiempo.
3. Se lavaron con PBS los portaobjetos.
4. Se introdujeron los portaobjetos en una solución de H_2O_2 para eliminar peroxidasas endogenas y se lavaron con PBS.
5. Se añadió solución bloqueante con suero.
6. Se añadió el anticuerpo primario, se incubó 60 minutos a temperatura ambiente y se enjuagó con PBS.

7. Se añadió el anticuerpo secundario, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se enjuagó con PBS.
8. Se añadió el conjugado enzimático, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se enjuagó con PBS.
9. Se añadió el cromógeno, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y se enjuagó con PBS.
10. Se observaron los cortes mediante un microscopio óptico.

5.9. Análisis morfométrico

Una vez obtenidos los inmunomarcajes de insulina se procedió a su registro fotográfico. En primer término se tomaron fotos a 40X que permitían una vista integral del corte y luego a 400X a cada IL encontrado. Posteriormente usando el programa de procesamiento de imágenes Image-Tool 2.0 se realizaron los análisis:

1. Número de IL: Se contaron todos los IL detectados mediante marcaje de insulina por individuo.
2. Porcentaje de área pancreática ocupada por IL: La sumatoria del área total correspondiente a los IL por individuo se dividió por el área total del corte y se multiplicó por cien.
3. Porcentaje de células beta/IL: Se contaron todas las células beta y se dividió entre el número total de células que conforman los IL por individuo y se multiplicó por cien.
4. Células endocrinas totales: Se contaron todas las células que conformaban los IL por individuo.

5.10. Análisis de resultados

Los resultados obtenidos en los ensayos se expresaron como la promedio $\pm$ error estándar de la media. El análisis estadístico de los resultados se efectuó mediante el programa Sigma Plot (11.0), utilizando la prueba “t” de Student para comparaciones entre 2 grupos de datos y el programa PAST (2.17) utilizando ANOVA no paramétrico (Kruskal-Wallis) para comparaciones entre más de dos grupos de datos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,050$.

6. RESULTADOS

6.1. Estandarización del modelo de daño pancreático con STZ

Debido a la alta variabilidad reportada en la capacidad de inducción de diabetes por parte de la STZ, en el presente trabajo se probaron diferentes dosis. La administración de 200 mg/kg (Lu y col., 1998) provocó un rápido aumento de la glicemia (por encima de los 300 mg/dl). Este efecto se observó en un 90% de los ratones a las 72h. Sin embargo, esta dosis indujo una elevada morbi-mortalidad (menos del 50% de supervivencia a los 9 días) (Figura 4-A). Por el contrario, la administración de una dosis de 120 mg/kg (Hayashi y col., 2006) resultó ser subdiabetogénica, ya que, tan solo un 20% de los ratones registró períodos variables de hiperglicemia, con inicio tardío (día 10), y supervivencia del 100% durante el período de estudio (Figura 4-B). Posteriormente se evaluó la dosis de 150 mg/kg (Hayashi y col., 2006), la cual indujo diabetes en un 90% de los ratones, sin embargo, la aparición de la hiperglicemia no solo fue tardía (50% de los ratones en seis días) y variable, sino que ésta alternaba con periodos normoglicémicos. Así mismo, al igual que con la dosis de 120 mg/kg, la supervivencia fue del 100% durante todo el período (Figura 4-C). Basándonos en estos resultados, se administró una dosis de STZ de 175 mg/kg. Esta dosis no solo indujo una rápida hiperglicemia (más del 90% de los animales estuvieron hiperglicémicos a las 72 horas), sino que ésta se mantuvo por encima de 300 mg/dl durante todo el período de evaluación de los animales. Adicionalmente, la supervivencia de los ratones fue mayor al 50% para el día 12 post-administración de la STZ (Figura 4-D). Con base en estos resultados, para los experimentos de inducción de diabetes experimental se seleccionó la dosis de 175 mg/kg de STZ.

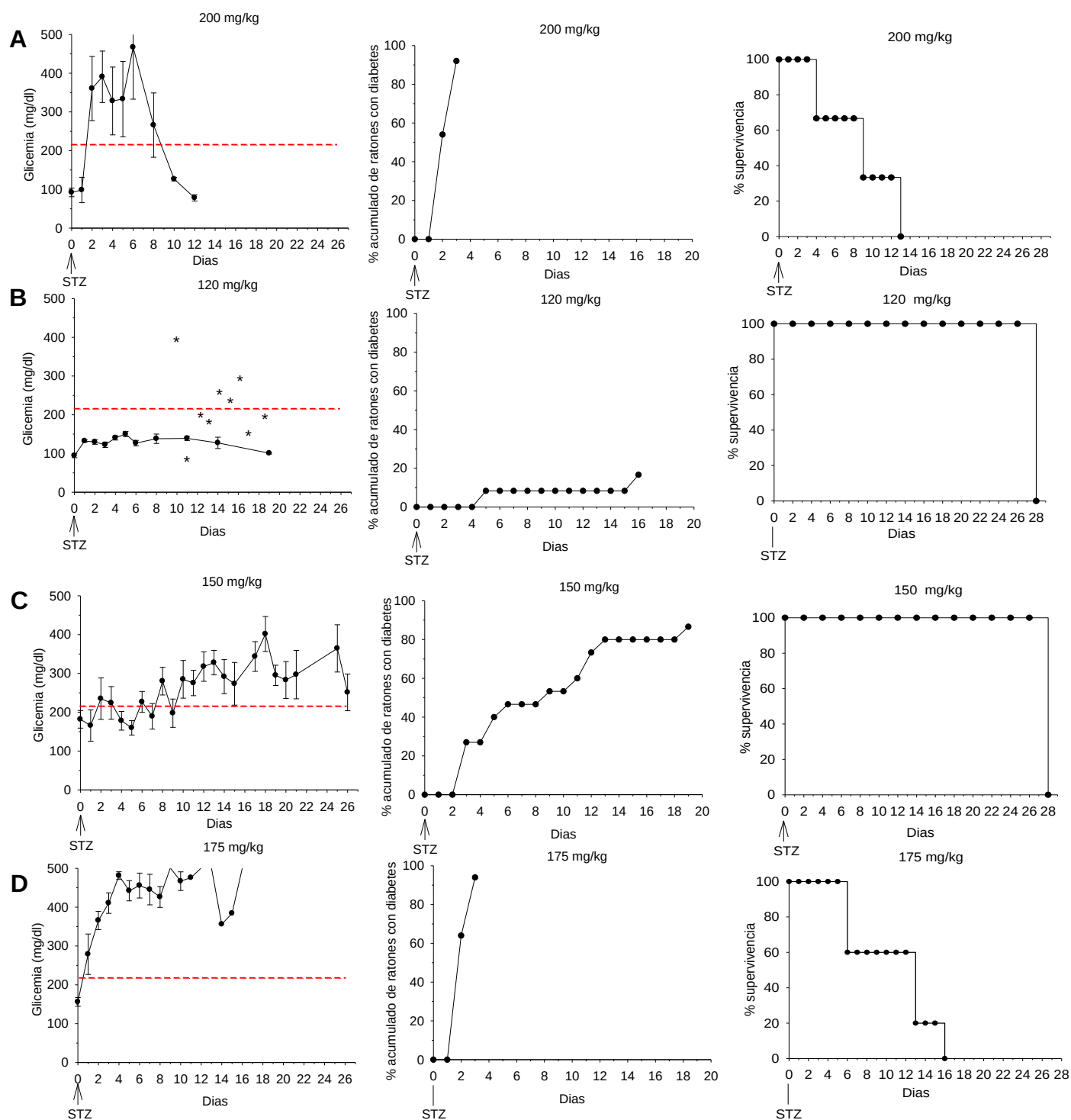


Figura 4. Efecto de la inyección de diferentes dosis de STZ sobre los niveles de glicemia y supervivencia de ratones C57BL/6. A. 200 mg/kg. B. 120 mg/kg. * = Niveles de glicemia del único ratón que presentó hiperglicemia. C. 150 mg/kg. D. 175 mg/kg. Los datos de glicemia se muestran como media $\pm$ error estándar. Cada grupo experimental está constituido por 4 a 5 animales.

6.2. Efecto de la administración de G-CSF y AMD3100 sobre la movilización de leucocitos en ratones diabéticos por STZ

Se examinó el efecto del G-CSF y AMD3100 sobre la movilización de leucocitos en sangre periférica, en cada uno de los grupos experimentales. Es bien conocido que la administración de G-CSF y AMD3100 inducen leucocitosis con un incremento en el número de CPH circulantes (Roberts y col., 1997; Rosenbeck y col., 2010). Se evaluó el número de leucocitos antes y después de la administración de G-CSF y/o AMD3100. La administración de STZ en ratones, para la inducción de diabetes, no indujo cambios en el número de leucocitos en sangre, comparado con ratones normales (7000 ± 2000 leucocitos/ μ l). De manera similar la administración de solución salina (vehículo) en este grupo no indujo cambios en el número de leucocitos. Tanto la administración de G-CSF como de AMD3100 en ratones diabéticos indujo un incremento significativo en el número de leucocitos comparado con los valores observados antes de la administración de estos movilizadores ($p \leq 0,001$ y $p \leq 0,01$, respectivamente) (Figura 5). La administración conjunta de G-CSF y AMD3100 indujo un mayor incremento de leucocitos en sangre, siendo éste unas seis veces mayor al valor inicial ($p \leq 0,001$) (Figura 5). En conjunto estos resultados muestran que tanto el G-CSF como el AMD3100 inducen la movilización de leucocitos a sangre periférica en ratones diabéticos inducidos por STZ.

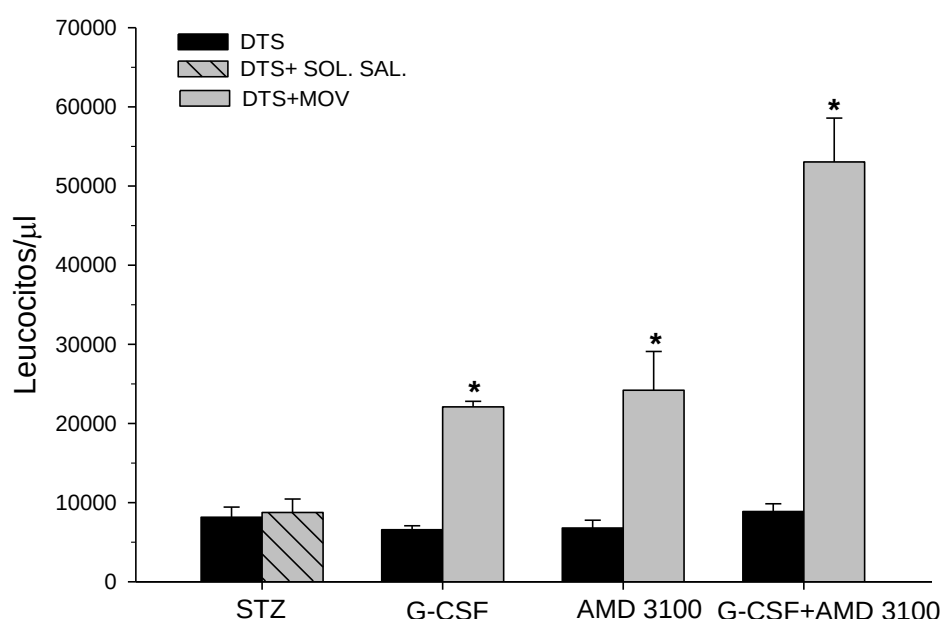


Figura 5. Movilización de leucocitos en sangre periférica inducida por G-CSF y AMD3100 en ratones diabéticos. DTS: Número de leucocitos en ratones diabéticos (48 horas continuas de hiperglicemia después de la administración de STZ). Número de leucocitos al finalizar el protocolo de administración del vehículo (solución salina; DTS+SOL.SAL) o de los movilizadores G-CSF y/o AMD3100 (DTS+MOV). El conteo leucocitario se realizó 2 horas después de la administración de AMD3100 (n=3) y 24 horas después de finalizado la administración de G-CSF o G-CSF+AMD3100 (n=3). Los resultados se muestran como promedio $\pm$ error estándar. * = Estadísticamente significativo comparado con DTS ($p \leq 0,05$).

6.3. Efecto de los agentes movilizadores de CMH G-CSF y AMD3100 sobre la diabetes inducida en ratones por STZ

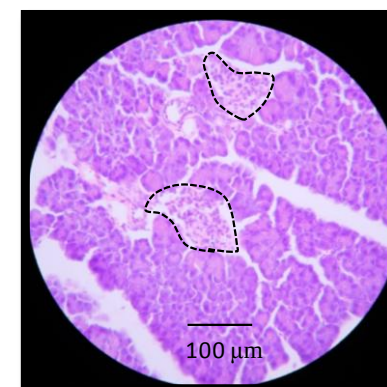
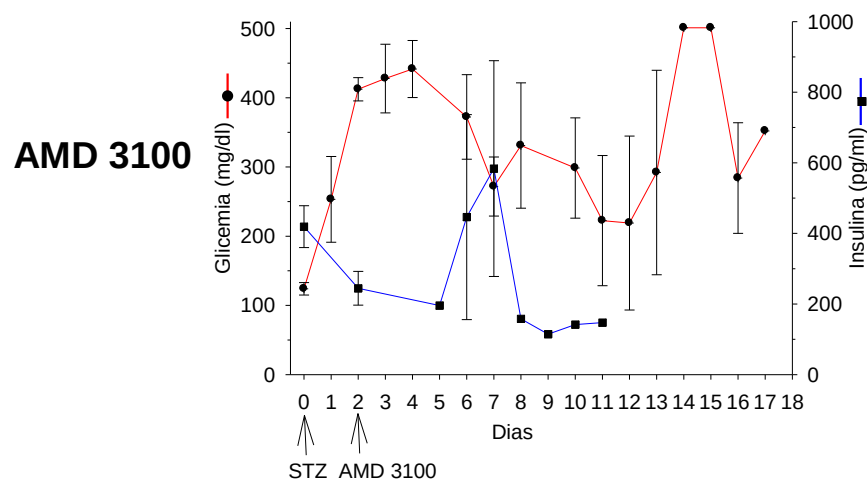
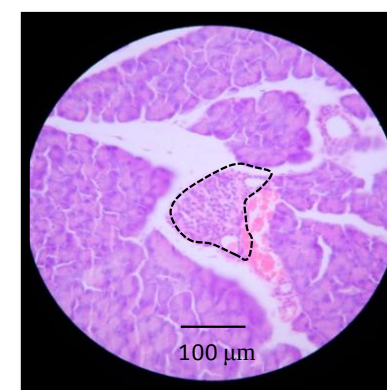
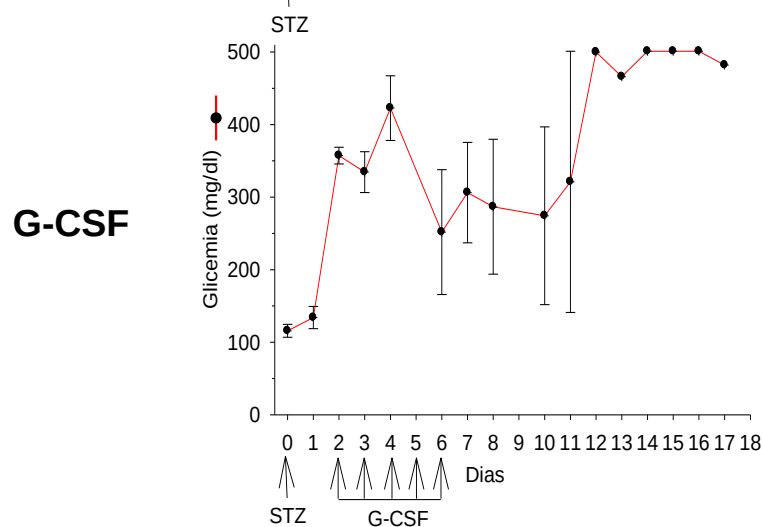
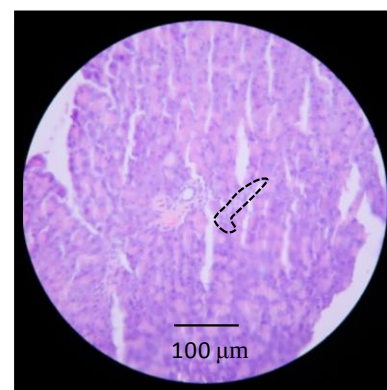
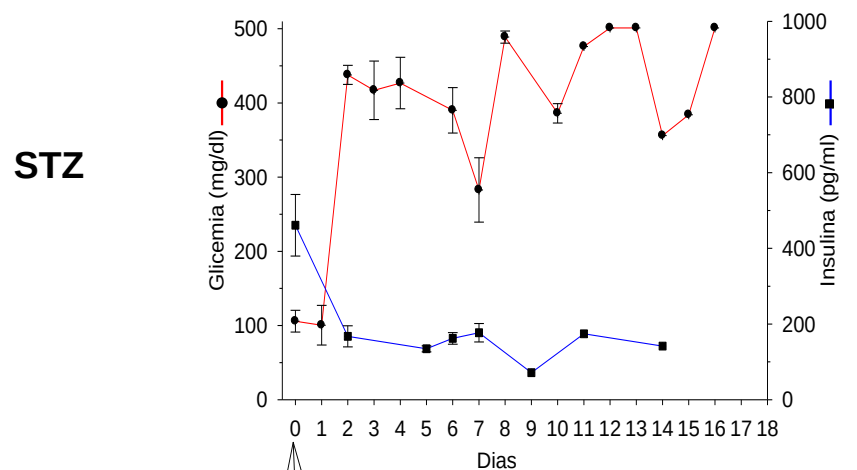
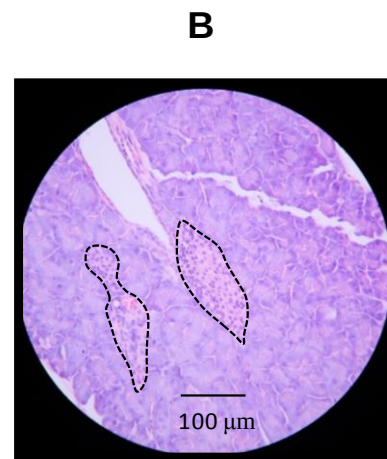
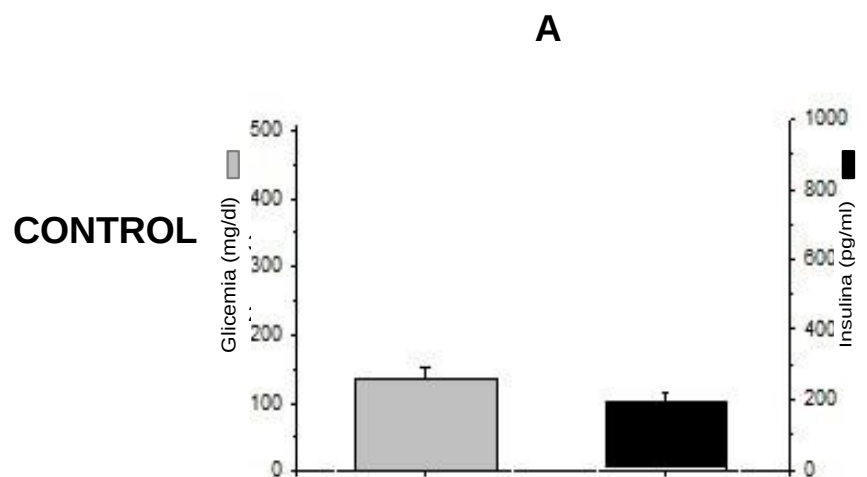
Ratones con diabetes inducida por STZ (175 mg/kg) fueron tratados con AMD3100 y G-CSF, administrados por separado o en protocolo combinado (ver materiales y métodos, Figura 3) para evaluar el posible efecto regenerativo de páncreas mediante la movilización de CMH. Las variables evaluadas para determinar si existía un posible efecto regenerativo fueron: 1) glicemia en ayuno; 2) concentración de insulina en sangre; 3) histología del tejido pancreático; 4) detección de células beta pancreáticas mediante técnicas de inmunohistoquímica y 5) cuantificación morfométrica de IL.

Animales sanos (control) mostraron valores de glicemia en ayuno de 137 ± 15 mg/dl y de insulina de 196 ± 24 pg/ml (Figura 6A, Control). Estudios histológicos de páncreas de estos animales, mostraron la presencia de numerosos IL constituidos por abundantes células endocrinas monomórficas, de núcleos redondeados y separadas por una gran trama vascular (Figura 6B, Control). Por el contrario, los ratones diabéticos tratados únicamente con STZ mostraron un rápido y sostenido aumento de glicemia (superior a los 300 mg/dl) asociado a una disminución significativa en la concentración de insulina en plasma (tres veces menor al valor inicial, en tan solo dos días) (Figura 6A, STZ). Análisis histológicos de páncreas de este grupo de animales mostraron una gran disminución no solo en el número y tamaño de los IL, sino también en el número de células endocrinas y poca vasculatura asociada (Figura 6B, STZ). La administración de G-CSF no indujo cambios significativos en los niveles de glicemia en ratones diabéticos (Figura 6A, G-CSF). En algunos casos se registraron períodos normoglicémicos o

cercanos a la normalidad en al menos un individuo. No fue posible la extracción de sangre suficiente para determinar las concentraciones de insulina en este grupo experimental. El análisis histológico de páncreas de este grupo se realizó en un solo ratón, evidenciándose la presencia de IL de tamaño variable, con abundantes células endocrinas monomórficas, de núcleos redondeados y con mayor vasculatura que el grupo que solo recibieron STZ (Figura 6B, G-CSF).

AMD3100 no indujo cambios significativos en los niveles de glicemia e insulina en ratones diabéticos (Figura 6A, AMD3100). Sin embargo, destaca en este grupo experimental el importante aumento en la producción de insulina registrado entre los días 6 y 7 (siendo este incluso mayor a la concentración inicial), el cual estuvo asociado a un descenso de la glicemia (Figura 6A, AMD3100). El análisis histológico de páncreas de este grupo mostró la presencia de IL de tamaño variable, constituidos (a diferencia del grupo de STZ) por abundantes células endocrinas monomórficas con mayor vasculatura asociada (Figura 6B, AMD3100).

Al igual que en los grupos de G-CSF y AMD3100, la administración de los dos movilizadores (G-CSF+AMD3100) no indujo cambios significativos en los niveles de glicemia e insulina en ratones diabéticos (Figura 6A, G-CSF+AMD3100). Sin embargo, estudios histológicos de este grupo mostraron la presencia de IL de características morfológicas similares a los ratones sanos, con abundantes células endocrinas monomórficas con importante cantidad de vasculatura asociada (Figura 6B, G-CSF+AMD3100).



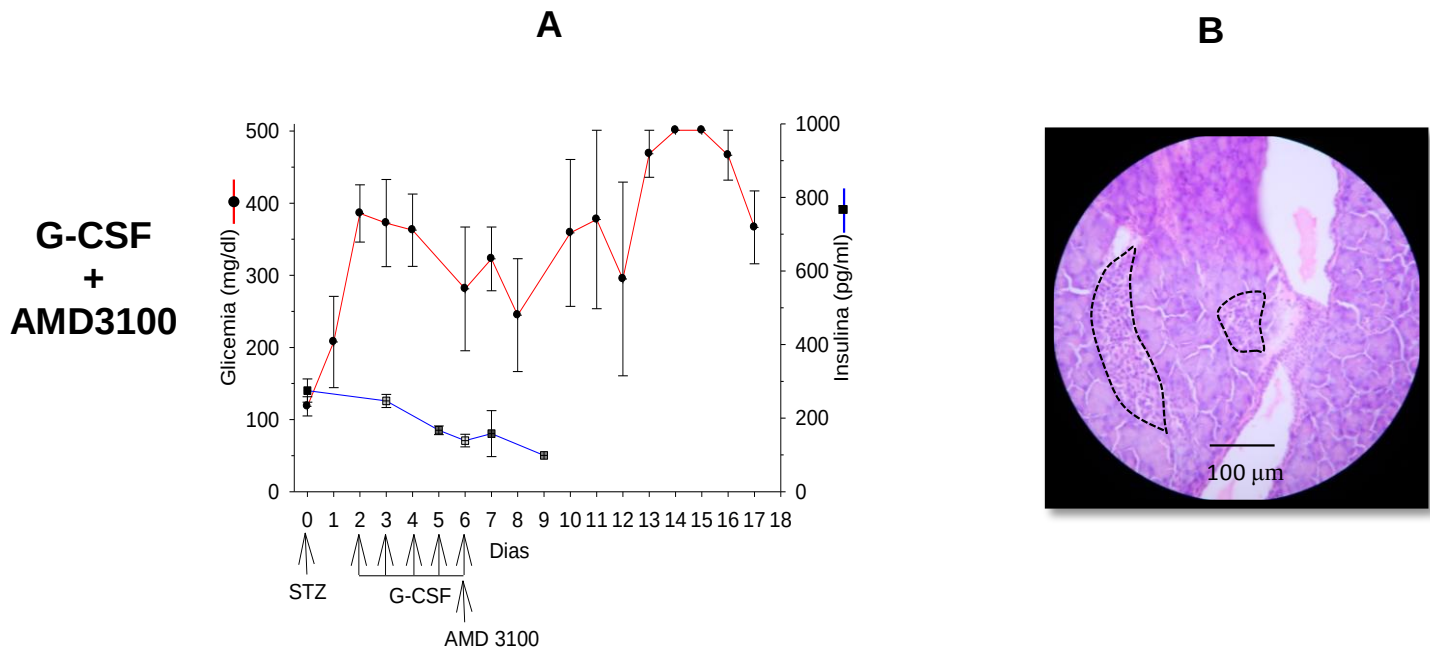


Figura 6. Efecto de AMD3100 y G-CSF sobre los niveles de glucosa, insulina e IL en ratones tratados con STZ. (A) Se evaluaron los niveles de glucosa (—●—) e insulina (—■—) y (B) características histológicas del páncreas (tinción H/E), en ratones diabéticos (inducidos por STZ) tratados con solución salina (control, n=4) o G-CSF (n=4) o AMD3100 (n=4) o G-CSF+AMD3100 (n=4). Un grupo de ratones diabéticos se mantuvo sin tratamiento (STZ) (n=4). Al grupo al cual se le administró G-CSF no se logró obtener suficiente cantidad de muestras de sangre para la determinación de insulina. Se muestra una histología representativa de páncreas de cada grupo. Los resultados se muestran como promedio $\pm$ error estándar.

6.4. Estudios inmunohistoquímico para la detección de células beta en páncreas de ratones diabéticos tratados con G-CSF y AMD3100

Basado en que los estudios histológicos de ratones diabéticos tratados con G-CSF y AMD3100 mostraron diferencias importantes en cuanto al número, tamaño y celularidad de los IL (comparados con los ratones diabéticos no tratados), por lo que se investigó mediante técnicas de inmunohistoquímica la presencia de las células productoras de insulina (células beta) en los páncreas de cada grupo experimental. Tal y como ha sido reportado, la mayor parte de las células que conforman los IL de animales sanos son del tipo beta (Welsch, 2008) (Figura 7A). En contraste, el tratamiento con STZ indujo no solo una reducción importante en el número de células beta, sino también en el tamaño y la celularidad total de los IL, con respecto a los ratones sanos (Figura 7B). Resultados similares, en cuanto a la disminución de células beta, se observaron en los grupos tratados con AMD3100 o

G-CSF+AMD3100. Sin embargo, los páncreas de estos grupos experimentales mostraron la presencia de IL con características morfológicas similares a los ratones sanos, y con un gran contenido celular (Figura 7C-D).

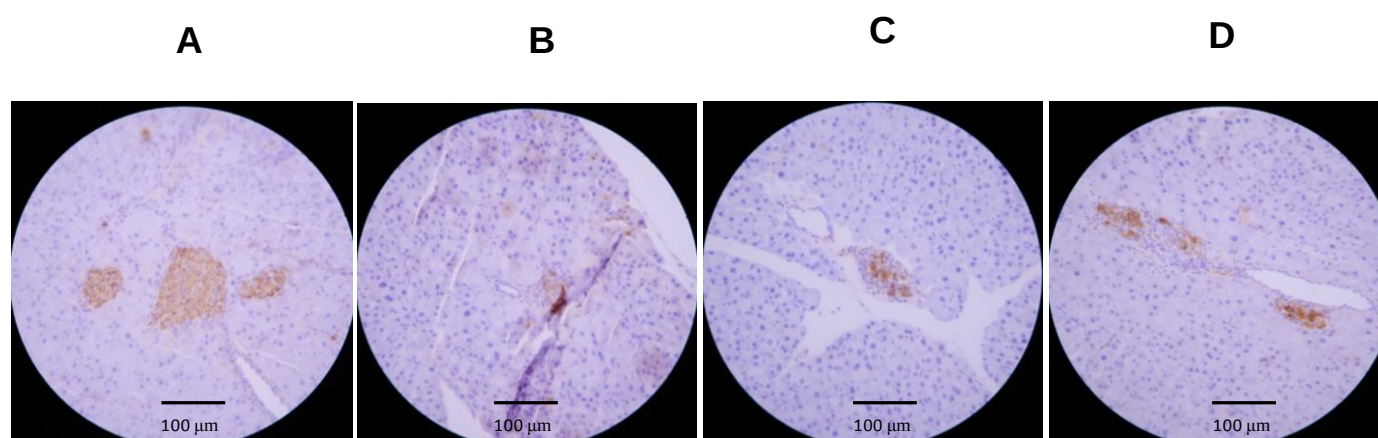


Figura 7. Detección de células beta en páncreas de ratón. Páncreas de ratones diabéticos (inducidos por STZ) fueron evaluados mediante inmunohistoquímica para la detección de células beta. Se muestra un estudio inmunohistoquímico representativo de grupo control (A, tratado con solución salina); grupo sin tratamiento (B, STZ); grupo tratado con AMD3100 (C); grupo tratado con G-CSF + AMD 3100 (D). No se pudo realizar esta técnica en el grupo tratado con G-CSF

Con el fin de cuantificar las observaciones descritas anteriormente, se realizó el análisis morfométrico de cada uno de los páncreas mediante el programa *Image Tool*. El análisis morfométrico mostró una disminución significativa en el número de IL en el grupo de animales diabéticos (tratados con STZ), comparados con el control (ratones sanos) (Figura 8A). Una disminución menor en el número de IL fue observada en el grupo de ratones diabéticos tratado con AMD3100 y G-CSF+AMD3100 (estadísticamente significativo comparado con el grupo diabético no tratado, $p \leq 0,05$). En el caso del grupo G-CSF+AMD3100, a pesar de la disminución en el número de IL, esta no fue significativa comparado con el control (ratones sanos) (Figura 8A). El mismo comportamiento fue observado al comparar el porcentaje de área pancreática total ocupada por los IL (Figura 8B). Por otro lado, no se encontraron diferencias estadísticas entre la proporción de células beta en los IL de ratones diabéticos (tratados con STZ) y los que fueron tratados con AMD3100 y G-CSF+AMD3100 (Figura 8C). La celularidad endocrina total en los animales diabéticos (tratados con STZ), se redujo significativamente comparada con el

control (ratones sanos) (Figura 8D). Una disminución mucho menor fue observada en los animales tratados con agentes movilizadores (estadísticamente significativo comparado con el grupo diabético no tratado, $p \leq 0,05$). En el caso de AMD3100, esta disminución de celularidad no fue significativa comparada con el control (ratones sanos).

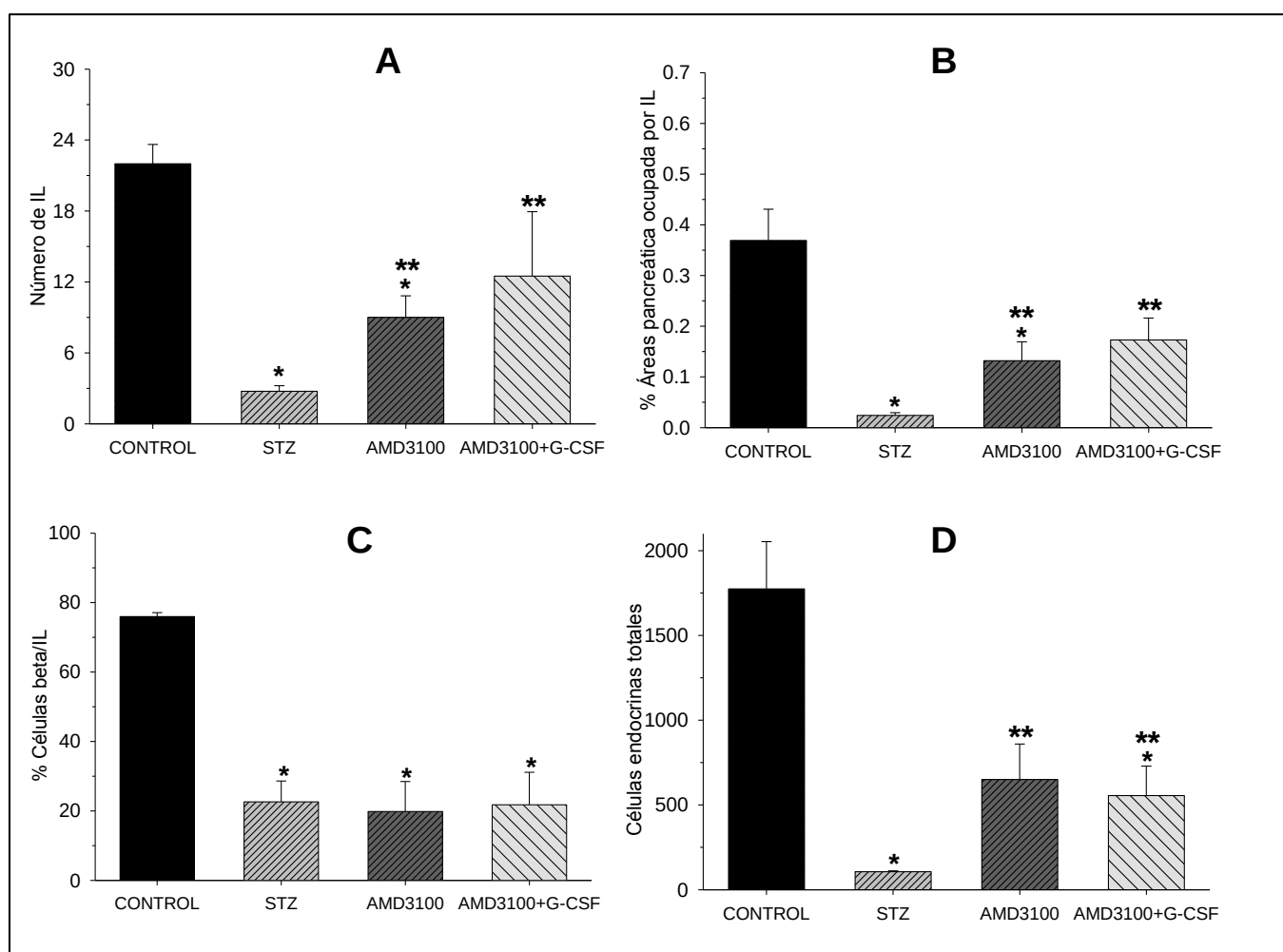


Figura 8. Análisis morfométrico de islotes de Langerhans y del contenido de células beta en páncreas de ratones diabéticos por STZ. Páncreas de ratones diabéticos fueron procesados mediante técnica de inmunohistoquímica para la detección de células beta. Mediante análisis morfométricos se determinó el número de IL totales en cada grupo experimental (A); el porcentaje de área ocupada por los IL con respecto al área total del páncreas (B); el porcentaje de células beta en los IL. (C) y el número de células endocrinas totales en los IL (D). Los resultados se muestran como promedio $\pm$ error estándar en cada grupo (n=4). * = Estadísticamente significativo comparado con grupo control ($p \leq 0,05$). **Estadísticamente significativo comparado con grupo STZ ($p \leq 0,05$).

7. DISCUSIÓN

A pesar de los grandes avances científicos en el campo de la DT1, actualmente la administración de insulina es el único tratamiento aceptado. Basado en el hecho de que al momento del diagnóstico de la DT1, más del 70% de células β han sido dañadas (Notkins y Lernmar., 2001), se ha planteado la posibilidad de la regeneración del páncreas mediante el uso de terapias celulares (Couri y col., 2012). En este sentido el trasplante de células β derivadas a partir de CM, ha sido postulado como una de las alternativas de mayor potencial para el tratamiento de la DT1. Sin embargo, aún existen limitaciones para la aplicación de estas tecnologías (Wagner y col, 2010). En el presente trabajo se planteó la hipótesis de que la movilización de CMH hacia la circulación sanguínea podría favorecer la regeneración pancreática en un modelo de diabetes experimental inducida por STZ.

Debido a que tanto la DT1 humana como la inducida con STZ en ratones resultan en un daño a las células β , este modelo ha sido usado para evaluar posibles terapias regenerativas con CM (Ezquer y col., 2008; Rackham y col., 2011). Dada la alta variabilidad en la inducción de diabetes reportada para este compuesto (Deeds y col., 2011), en el presente estudio evaluamos la dosis adecuada de STZ para inducir diabetes en ratones. Para esto evaluamos 4 diferentes dosis, las cuales han sido reportadas previamente: 200, 175, 150 y 120 mg/kg (Lu y col., 1998; Merino y col., 1997; Hayashi y col., 2006;). La administración de 200 mg/kg estuvo asociada con una alta morbilidad y mortalidad de los ratones C57BL/6, posiblemente como consecuencia de un severo daño pancreático y/o hepático causado por la alta concentración de STZ (Kume y col., 2004). Estos resultados contrastan con lo reportado por Lu y colaboradores para esta dosis. De igual forma se descartó la utilización de 120 y 150 mg/kg debido a que resultaron subdiabetogénica y diabetogénica tardía, respectivamente. Estos resultados contrastan con lo reportado por Hayashi y colaboradores, quienes mostraron que estas dosis eran diabetogénica o altamente diabetogénica. En nuestro estudio, la administración de 175 mg/kg indujo hiperglicemia temprana, mantenida en el tiempo, disminución en los niveles de insulina y sobrevida de los animales deseada para el período de evaluación. En conjunto, estos resultados evidencian la altísima variabilidad en la sensibilidad hacia el compuesto STZ, de la cepa de ratones C57BL/6. Debido a que

en nuestro estudio se realizó un control estricto de variables como género, peso y forma de preparación de la droga, es posible que la variabilidad observada esté relacionada a pequeñas variaciones genéticas de la cepa C57BL/6 entre los distintos bioterios alrededor del mundo (Deeds y col., 2011).

La movilización de CMH ha sido usada clínicamente para realizar trasplantes autólogos de MO y de esta manera reconstituir o regenerar este tejido después de tratamientos de quimioterapia (Schmitz y col., 1996; Copeland y col., 2006). En la actualidad, existen algunos compuestos que inducen la movilización de leucocitos y CMH desde la MO hacia sangre periférica. Entre estos, en clínica humana han sido usados ampliamente la citoquina G-CSF y el compuesto AMD3100 (Hendrix y col., 2000; Rosenbeck y col., 2010). La administración de estos agentes induce una rápida leucocitosis asociada a un incremento en el número de CMH en sangre (Roberts y col., 1997; Rosenbeck y col., 2010). Por esta razón, el conteo de leucocitos es una medida indirecta y rápida para determinar si se indujo o no movilización de CMH. En nuestro estudio la administración de G-CSF y/o AMD3100 en ratones diabéticos indujo un incremento significativo del número de leucocitos comparado con los valores observados previo a la administración de estos agentes. Interesantemente, la administración conjunta de G-CSF y AMD3100 indujo un efecto sinérgico sobre el aumento de leucocitos en sangre, tal y como ha sido reportado previamente (Broxmeyer y col., 2005). Nuestros resultados constituyen la primera evidencia reportada de que AMD3100 solo o en combinación con G-CSF inducen leucocitosis en ratones diabéticos inducidos por STZ. Así mismo, estos resultados permiten evaluar el efecto de la movilización de CMH sobre la regeneración pancreática en ratones diabéticos, evaluada por cambios en los niveles de glicemia e insulina.

Nuestros resultados indican que la administración de G-CSF y/o AMD3100 no indujo en ninguno de los grupos experimentales de ratones diabéticos una disminución de la glicemia, ni aumento en la producción de insulina. Con relación al G-CSF, nuestros datos concuerdan con los reportados por Lavazais y colaboradores en 2006, que en ratones diabéticos inducidos por dosis bajas de STZ (115 mg/kg) encontraron que la administración de esta citoquina no indujo cambios significativos en los niveles de glicemia. A pesar de que no observamos cambios significativos en los niveles de glicemia e insulina, posterior a la administración de G-CSF y

AMD3100, estudios histológicos (H/E) de páncreas de estos animales mostraron que los IL de estos grupos tenían características similares en tamaño, forma y celularidad a los IL de animales sanos (no tratados con STZ). Así mismo, tanto G-CSF como AMD3100 redujeron significativamente el daño de los IL inducido por STZ. De acuerdo a nuestro conocimiento, es la primera vez que se reporta el efecto protector o regenerativo (mantenimiento del tamaño de IL y celularidad endocrina) de G-CSF y AMD3100 sobre los IL en ratones con diabetes inducida por STZ.

Una vez demostrado el posible efecto protector de G-CSF y/o AMD3100 de los IL en ratones diabéticos inducidos por STZ, evaluamos el contenido de células β en los IL de cada uno de los grupos experimentales. Para esto, realizamos estudios de detección de células β a través de marcajes inmunohistoquímicos de la insulina. Es bien conocido que los IL están conformados por 5 tipos celulares y que las células β constituyen entre 60-80% del total de las células de cada islote (Welsch, 2008). Lo anterior fue confirmado, en este estudio, en el grupo de ratones sanos, cuyos IL estaban constituidos por una mayoría de células β . En contraste, en todos los grupos experimentales de ratones diabéticos se observó una drástica disminución del marcaje de insulina en los IL, lo cual es evidencia directa de una significativa reducción de las células β en el tejido pancreático de estos animales. Estos resultados explican la presencia del estado hiperglicémico y bajos niveles de insulina detectados en todos los grupos experimentales. De igual forma, éstos indican que el tratamiento con G-CSF y/o AMD3100 no protegió contra el daño de las células β ocasionado por la STZ. A pesar de que los IL de los animales tratados con los movilizadores de CMH presentaban características similares a los ratones sanos, la alta celularidad observada en estos islotes puede estar relacionada con la proliferación de otros grupos celulares que constituyen los IL. Es posible que los IL de los grupos experimentales estén constituidos en su mayoría por células alfa, tal y como ha sido reportado luego del tratamiento con STZ (Li y col., 2000). Esta posibilidad será investigada próximamente mediante la detección de células alfa mediante técnicas de inmunohistoquímica.

El posible efecto protector de G-CSF y/o AMD3100 de los IL en ratones diabéticos inducidos por STZ podría ser atribuido al establecimiento de nichos regenerativos por parte de los progenitores hematopoyéticos movilizados, los cuales migraron hacia el páncreas como consecuencia del daño tisular inducido por la STZ.

Estos nichos de CMH posiblemente indujeron, por un efecto paracrino, la proliferación y diferenciación de progenitores pancreáticos, localizados en los ductos, a células endocrinas del páncreas no del tipo β . Adicionalmente, es posible que nichos de CMH puedan promover la proliferación de células alfa de los IL. Un proceso similar ha sido descrito por Yannaki y colaboradores en 2005, luego de la administración de G-CSF en ratones con daño hepático agudo. En el caso de las células β , es posible que la formación de nichos regenerativos de CMH en el páncreas de ratones diabéticos, no es suficiente para restablecer el estado normoglicémico en estos animales debido a varias razones: 1) la alta dosis de STZ, usada en nuestro modelo, combinado con la extremadamente baja tasa de autoreplicación de las células β (1/1400/día) (Teta y col., 2005), haga irreversible la recuperación de esta población celular, y 2) La tasa de recuperación del número de células β no sea suficiente para restituir los valores normales de glicemia/insulina. Experimentos futuros que permitan determinar la presencia de células alfa en los IL y progenitoras hematopoyéticas (células c-kit⁺) en el tejido pancreático, proveerán de más información para conocer acerca de los posibles mecanismos involucrados en estos procesos. Resultados preliminares de los estudios histológicos realizados en este estudio sugieren la presencia de CMH (células con morfología tipo linfoide) en las cercanías de ductos e IL, lo cual soporta nuestra hipótesis de establecimiento de nichos de CMH en el tejido pancreático de ratones tratados con STZ. De confirmarse lo anterior, este trabajo abre la posibilidad de la utilización de este protocolo en situaciones clínicas como pancreatitis aguda, donde la inyección de movilizadores podría ser un complemento al tratamiento tradicional que busque evitar el daño de los IL y el posterior desarrollo de DT1 en estos pacientes.

8. CONCLUSIONES

1. La movilización de CMH, inducida por G-CSF y/o AMD3100, no mejoró la hiperglicemia ni los bajos niveles de insulina observados en los animales diabéticos.
2. La movilización de CMH, inducida por G-CSF y/o AMD3100, ejerció un efecto protector y/o regenerativo de los IL de ratones con diabetes inducida por STZ
3. El efecto protector y/o regenerativo estuvo relacionado con las poblaciones celulares endocrinas no beta
4. En todos los grupos experimentales se observó una disminución significativa en el número de células beta de los IL.
5. El efecto protector de G-CSF y/o AMD 3100 sobre los IL de ratones diabéticos podría estar relacionado con el establecimiento de "nichos regenerativos" por parte de los progenitores hematopoyéticos movilizados.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. 2002. *Inmunología Celular y Molecular*. Ed. Elseiver. Tercera edición, Madrid, España

Abkowitz, J.L., Robinson, A.E., Kale, Long, M.W., Chen, J. 2003. Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. *Blood* 102:1249-53.

Alegre, A. 2008. AMD 3100 un nuevo agente movilizador de progenitores hematopoyéticos. *Haematologia*. 93:443-449

American Diabetes Association (ADA). 2012. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 35: 564-571

Beilhack, G.F., Scheffold, Y.C., Weissman, IL., Taylor, C., Jerabek, L., Burge, M.J., Masek, M.A., Shizuru, J.A. 2003. Purified allogenic hematopoietic stem cell transplantation blocks diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 52:59-67

Bennett, R.A., Pegg, A.E. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. 1981. *Cancer Research*. 41:2786–2790

Bonner, W.S., Taneja, M., Weir, G.C., Tatarkiewicz, K., Song, K.H. 2000. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Protocols National Academy of Science USA*. 97: 7999-8004

Bonner, W.S., Weir, G.C. 2005. New sources of pancreatic beta cells. *Nature Biotechnology*. 23: 857-861

Broxmeyer, E., Orschell, C., Clapp, W. 2005. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *The Journal of Experimental Medicine*. 201:107-1018

Cashen, A.F., Link, D., Devine, S., Dpersio, J. 2004. Cytokines and stem cell mobilization for autologous and allogenic transplantation. *Current Hematology*. 3:406-412.

Copeland, E.A. (2006). Hematopoietic stem-cell transplantation. *New England Journal Medicine*. 354:1813-26.

Couri, C.E., A.B., Oliveira, M.C., Moraes, D.A., Pieroni., Voltarelli, J.C. 2009. C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative. hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA*. 301:1573-1579

Couri, C.E., Oliveira, M., Simões. B. 2012. Risks, benefits, and therapeutic potential of hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diabetes. *Current Diabetes Reports*. 11:32-40

Deeds, M.C., Anderson, J.M., Armstrong, A.S. 2011. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Laboratory Animals*. 45:131-140

Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I., Melton, D.A. 2004. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*.;429: 41–44.

Eglitis, M.A., Mezey, E. 1997. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adults mice. *Proceeding of the National Academy Sciences USA*. 94:4080-4085.

Elsner, M., Guldbakke, B., Tiedge, M., Munday, M., Lenzen, S. 2000. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*. 43:1528-1533

Ezquer, F. E., Ezquer, M. E., Parrau, D. B., Carpio, D., Yañez, A. J., Conget, P.A, 2008. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 14:631-640

Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C.D. 1999. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 401:390-394

Hayashi, K., Kojima, R., Ito, M. 2006. Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice. *Biological. Pharmaceutical. Bulletin*. 29: 1110-1119.

Hendrix, C., Flexner, C., Macfarland, R. 2000. Pharmacokinetics and safety of AMD3100, a novel antagonist of the CXCR-4 chemokine receptor, in human volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44: 1667-1673

Herr, R.R., Eble, T.E., Bergy, M.E., Jahnke, H.K. 1960. Isolation and Characterization of streptozotocin. *New York Medical Encyclopedia*. 236

Ikehara, S., Ohtsuki, H., Good, R.A., Asamoto, H., Nakamura, T., Sekita, K., Muso, E., Tochino, Y., Ida, T., Kuzuya, E. 1985. Prevention of type I diabetes in non obese diabetic mice by allogenic bone marrow transplantation. *Proceeding of the National Academy Sciences USA*. 82:7743-7747

Kang, E.M., Zickler, P.P., Burns, S., Langemeijer, S.M., Brenner, S., Phang, O.A., Patterson, N., Harlan, D., Tisdale, J.F. 2005. Hematopoietic stem cell transplantation prevents diabetes in NOD mice but does not contribute to significant islet cell regeneration once disease is established. *Experimental Hematology*. 33:699-705

Kaushansky, K. 2006. Lineage specific hematopoietic growth factors. *New England Journal of Medicine*. 354:2034-2045.

Kume, E., Fujimura, H., Matsuki, N. 2004. Hepatic changes in the acute phase of streptozotocin (SZ)-induced diabetes in mice. *Experimental and Toxicology Pathology*. 55: 467–480.

La Face, D.M., Peck, A.B. 1989. Reciprocal allogenic bone marrow transplantation between NOD mice and diabetic-nonsusceptible mice associated with transfer and prevention of autoimmune diabetes. *Diabetes*. 38:894-901

Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M. 2000. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Medicine*. 6:1229-1234

Lanza, R., Gearhart, J., Hogan, B., Melton, D., Pedersen, R., Thomson, J., Thomas, E.D., West, M. 2006. *Essentials of Stem Cell Biology*. Ed. Elsevier. 1ST edition, Londres, Inglaterra

Lavazais, E., Pogu, S., Martignat, L. 2007. Cytokine mobilization of bone marrow cells and pancreatic lesion do not improve streptozotocin-induced diabetes in mice by transdifferentiation of bone marrow cells into insulin-producing cells. *Diabetes & metabolism*. 33. 68-78.

Lenzen, S. 2008. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*.51:219-226

Li, H., Kaufman, C.L., Boggs, S.S., Johnson, P.C., Patrene, K.D, Ildstad, S.T. 1996. Mixed allogenic chimerism induced by a sublethal approach prevents autoimmune diabetes and reverses insulinitis in non obese diabetic (NOD) mice. *Journal of Immunology*.156:380-388.

Li, Z., Karlsson, F., Sandler, S. 2000. Islet loss and alpha cell expansion in type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin administration in mice. *Journal of Endocrinology*. 165: 93-99.

Lu, W.T., Juang J.H., Hsu, B.R., Huang, H.S. 1998. Effects of high or low dose of streptozocin on pancreatic islets in C57BL/6 and C.B17-SCID mice. *Transplantation Proceedings*.30:609–610.

Merino, J., Nacher, V., Raurell, M., Aranda, O., Soler, J., Montaya, E. 1997. Improved outcome of islet transplantation in Insulin-treated diabetic mice: effects on beta- cell mass and function. *Diabetologia*. 40: 1004-1010.

Mezey,E., Chandross, K.J., Harta, G., Maki,R.A., Mckercher, S.R. 2000. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*.290: 1779-1782.

Notkins, A., Lernmark, A. 2001. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *Journal of Clinical Investigation*.108:1247-1252.

Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Bodine, D.M, Leri, A, Anversa, P.2001. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Annals of the New York Academy of Science*.938:221-229.

Palis, J. 2008. Ontogeny of erythropoiesis. *Current opinion in Hematology*. 15:155-161.

Pitchford, S.C., Furze, R.C., Jones, C.P., Wengner, A.M., Rankin, S.M.2009. Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow. *Cell Stem Cell*.4:62-72.

Pusic, I., Di persio, J.F. 2010. Update on a clinical experience with AMD3100, an SDF-1/CXCL12-CXCR4 inhibitor, in mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. *Current opinion in Hematology*.17:319-326.

Rackham, C.L., Chagastelles, P.C., Nardi, N.B., Hauge, A.C., Jones, P.M., King, A.J.F. 2011. Co-transplantation of mesenchymal stem cells maintains islet organization and morphology in mice. *Diabetologia*.54:1127-1135.

Rakieten, N., Rakieten, M.L., Nadkarni, M.V.1963. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemotherapy. Reports*.29: 91-98.

Reichert, M., Rustgi, A.K. 2011. Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia. *Journal of Clinical Investigation*. 121: 4572-4578

Roberts, A., Foote, S., Alexander, W., Scott, C., Robb, L., Metcalf. 1997. Genetic influences determining progenitor cell mobilization and leukocytosis induced by G-CSF. *Blood*.89: 2736-2744.

Rosenbeck, L., Srivastava, S., Kiel,P. 2010.Peripheral blood stem cell mobilization tactics,*The Annals of Pharmacotherapy*. 44: 107-113.

Schmitz, N., Linch, P., Goldstone, A. 1996. Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients. *Lancet* 347:353-7.

Schnedl, W.J., Ferber Sarah., Jhonson, J.H., Newgard, C.B.1994. STZ Transport and Cytotoxicity- Specific Enhancement in GLUT2-Expressing Cells.*Diabetes*.43:1326-1333.

Teta, M., Long, S., Wartschow, L. 2005. Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes*. 54:2557–2567.

Theise, N.D., Badve, S., Saxena, R. 2000. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology*.31:235-240.

Till, J.E., McCulloch, E.A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research*.14: 1414-1430.

Verfaillie, C.M., Pera, F.M., Lansdrop, P.M. 2002. Stem cells. Hype and Reality. *Hematology*. 369-387

Voltarelli, J.C., Couri, C.E.B., Stracieri, A.B., Oliveira, M.C., Moraes, D.A., Pieroni, F. 2007. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *Journal of American Medical Association*. 297:1568-1576.

Wagner, R., Lewis, J., Cooney, A., Chan, L. 2010. Stem cell approaches for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Translational Research*. 156: 169-179.

Weissman, IL. 2000. Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units of Evolution. *Cell*. 100, 157-168.

Weissman, IL., Anderson, D.J., Gage, F. 2001. Stem and progenitors cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual Review. Cell Developmental. Biology*. 17, 387-403.

Welsch, U. 2008. Histología. Ed. Medica Panamericana, Segunda edición, Madrid, España.

Xiaobo, X., Joke, H., Geert, S., Stefan, B., Nico D. L. 2008. β cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell*. 132:197-207

Yangguang, Y., Land, H., Xiaohui, Z., Yuqiang, F. 2007. AMD3100 mobilizes endothelial progenitor cells in mice, but inhibits its biological functions by blocking an autocrine paracrine regulatory loop of stromal cell derived factor-1 in vitro. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 50:61-66.

Yannaki, E., Athanasiou, E., Xagorari, A., Constantinou, V., Batsis, I. 2005. G-CSF primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Experimental Hematology*. 33: 108-119.