

## Original

# Cambios en la homeostasis de la glucosa y la proliferación de la célula beta pancreática tras el cambio a ciclosporina en la diabetes inducida por tacrolimus

Ana Elena Rodríguez-Rodríguez<sup>a</sup>, Javier Triñanes<sup>a</sup>, Esteban Porrini<sup>a,\*</sup>,  
Silvia Velázquez-García<sup>b</sup>, Cecilia Fumero<sup>a</sup>, María Jose Vega-Prieto<sup>c</sup>,  
María Luisa Díez-Fuentes<sup>c</sup>, Sergio Luis Lima<sup>a</sup>, Eduardo Salido<sup>d</sup> y Armando Torres<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Canarias, San Cristóbal de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, España

<sup>b</sup> Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, España

<sup>c</sup> Laboratorio central, Hospital Universitario de Canarias, San Cristóbal de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, España

<sup>d</sup> Centro para la Investigación Biomédica de Canarias, Universidad de La Laguna, San Cristóbal de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, España

<sup>e</sup> Servicio de Nefrología, Hospital Universitario de Canarias, San Cristóbal de La Laguna, Santa Cruz de Tenerife, España

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

## Historia del artículo:

Recibido el 28 de agosto de 2014

Aceptado el 18 de febrero de 2015

On-line el 27 de junio de 2015

## Palabras clave:

Diabetes postrasplante

Tacrolimus

Ciclosporina-A

## RESUMEN

**Antecedentes:** El cambio a ciclosporina A podría revertir la diabetes inducida por tacrolimus. Sin embargo, los mecanismos de esta reversibilidad se desconocen.

**Métodos:** Usamos como modelo de diabetes inducida por tacrolimus las ratas Zucker obesas. Un grupo de 44 ratas Zucker obesas fue tratado con tacrolimus durante 11 días (0,3 mg/kg/día) hasta que desarrollaron diabetes; posteriormente, a) 22 fueron sacrificadas a día 12 como grupo referencia (tacrolimus-d12), y b) en otras 22 el tacrolimus fue reemplazado por ciclosporina (2,5 mg/kg/día) durante 5 días (tacrolimus-ciclosporina). Veintidós ratas Zucker obesas recibieron vehículo durante 17 días (grupo control). A todos los animales se les realizó una sobrecarga intraperitoneal de glucosa al final del experimento.

**Resultados:** Se analizó la proliferación de la célula  $\beta$ , la apoptosis y la expresión del gen *Ins2*. En el grupo tacrolimus-ciclosporina, los niveles de glucemia mejoraron significativamente en cada punto del test intraperitoneal de glucosa comparados con el grupo tacrolimus-d12. La diabetes se redujo del 100% en los tacrolimus-d12 hasta el 50% en tacrolimus-ciclosporina. La proliferación de las células  $\beta$  en tacrolimus-ciclosporina se incrementó en comparación con tacrolimus-d12, pero fue menor que en los tratados con vehículo. La expresión génica de *Ins2* en tacrolimus-ciclosporina fue comparable a los tratados con el vehículo.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [estebanporrini72@hotmail.com](mailto:estebanporrini72@hotmail.com) (E. Porrini).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nefro.2015.05.007>

0211-6995/© 2015 The Authors. Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Nefrología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**Conclusión:** El cambio temprano de tacrolimus por ciclosporina en la diabetes inducida por tacrolimus incrementa la proliferación de la célula  $\beta$  y revierte la diabetes en un 50% de los casos.

© 2015 The Authors. Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Nefrología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Glucose homeostasis changes and pancreatic $\beta$ -cell proliferation after switching to cyclosporin in tacrolimus-induced diabetes mellitus

### A B S T R A C T

#### Keywords:

Post-transplant diabetes mellitus  
Tacrolimus  
Cyclosporin A

**Background:** Switching to cyclosporin A may result in a reversion of tacrolimus-induced diabetes mellitus. However, mechanisms underlying such a reversion are still unknown.

**Methods:** Obese Zucker rats were used as a model for tacrolimus-induced diabetes mellitus. A cohort of 44 obese Zucker rats received tacrolimus for 11 days (0.3 mg/kg/day) until diabetes development; then: (a) 22 rats were euthanized at day 12 and were used as a reference group (tacrolimus-day 12), and (b) 22 rats on tacrolimus were shifted to cyclosporin (2.5 mg/kg/day) for 5 days (tacrolimus-cyclosporin). An additional cohort of 22 obese Zucker rats received the vehicle for 17 days and were used as a control group. All animals underwent an intraperitoneal glucose tolerance test at the end of the study.

**Results:**  $\beta$ -cell proliferation, apoptosis and *Ins2* gene expression were evaluated. Compared to rats in tacrolimus-day 12 group, those in tacrolimus-cyclosporin group showed a significant improvement in blood glucose levels in all assessment points in intraperitoneal glucose tolerance test. Diabetes decreased from 100% in tacrolimus-day 12 group to 50% in tacrolimus-cyclosporin group. Compared to tacrolimus-day 12 group, rats in tacrolimus-cyclosporin group showed an increased  $\beta$ -cell proliferation, but such an increase was lower than in rats receiving the vehicle. *Ins2* gene expressions in rats receiving tacrolimus-cyclosporin and rats receiving the vehicle were comparable.

**Conclusion:** An early switch from tacrolimus to cyclosporin in tacrolimus-induced diabetes mellitus resulted in an increased  $\beta$ -cell proliferation and reversion of diabetes in 50% of cases.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Española de Nefrología. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introduction

Los inhibidores de la calcineurina (ICN): ciclosporina-A (CsA) y tacrolimus (TAC), juegan un papel central en la inmunosupresión tras el trasplante renal, siendo TAC el más ampliamente usado<sup>1</sup>. TAC ofrece ventajas sobre CsA en términos de una mejor función del injerto y de menores tasas de rechazo agudo<sup>1,2</sup>, pero se asocia a una mayor incidencia de diabetes mellitus postrasplante (DMPT)<sup>3</sup>. La incidencia de DMPT oscila entre el 15 y el 25%<sup>4-6</sup> y está asociada a mayores tasas de enfermedad cardiovascular y a un incremento en los costes sanitarios<sup>3,7,8</sup>. Con esto, el estudio de la DMPT inducida por TAC es relevante para establecer estrategias preventivas y terapéuticas tempranas que reduzcan sus consecuencias en esta población.

De acuerdo con las guías actuales<sup>3,9</sup>, la DMPT está considerada un *fait accompli* y su tratamiento sigue las pautas terapéuticas de la diabetes tipo 2: antidiabéticos orales y/o insulina<sup>9</sup>. Sin embargo, raramente se actúa sobre el compuesto que más frecuentemente produce DMPT: el TAC, a pesar de que la CsA tiene un menor efecto diabético que este<sup>3,8,9</sup>. El cambio de TAC por CsA para la reversión de DMPT

rara vez ha sido propuesto. En un estudio retrospectivo de 34 casos de DMPT, Ghisdal et al.<sup>10</sup> demostraron unas tasas de remisión del 42% un año después del cambio de TAC a CsA, comparado con el 0% en el grupo control que se mantuvo con TAC. Sin embargo, hasta donde conocemos, no se ha realizado ningún estudio con modelos animales para establecer los mecanismos por los que el cambio de TAC a CsA pudiera ser una opción terapéutica en el tratamiento de la DMPT.

Nuestro grupo ha investigado previamente el efecto de los ICN en la homeostasis de la glucosa y en la célula  $\beta$  en animales tanto con resistencia a la insulina como sin ella<sup>11</sup>. En este modelo, los ICN solo inducían diabetes en animales insulinoresistentes, y TAC inducía más diabetes que CsA (100% vs. 40%). Además, los animales con CsA presentaban alteraciones menos severas en la homeostasis de la glucosa según los test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa como en las glucemias en ayunas. Estos hechos se pueden explicar por una menor reducción de la proliferación de la célula  $\beta$  y de la expresión del gen de la insulina con CsA que con TAC<sup>11</sup>. Con estos datos, el objetivo de este estudio es investigar si el cambio de TAC a CsA en animales insulinoresistentes con diabetes inducida por TAC puede mejorar la homeostasis de la glucosa a través de la inducción de cambios en las tasas de

proliferación y apoptosis de la célula  $\beta$  y la expresión del gen de la insulina.

## Material y métodos

### Animales

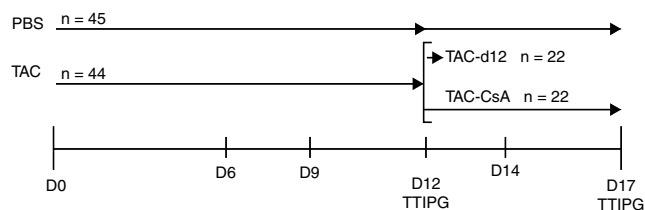
En un estudio previo<sup>11</sup> investigamos el efecto de los ICN sobre la homeostasis de la glucosa en animales tanto resistentes como sensibles a la insulina, a saber, ratas Zucker obesas (RZO) y delgadas (RZL). Las RZO tienen una mutación homocigótica en el receptor de la leptina (*fa/fa*)<sup>12,13</sup> que como resultado produce hiperfagia, obesidad, hiperlipidemia y resistencia a la insulina severa<sup>14,15</sup>. Las RZO, en condiciones normales, son capaces de mantener la euglucemia gracias a una elevada proliferación de las células  $\beta$  y a una hipersecreción de insulina<sup>16</sup>. Llama la atención el hecho de que los ICN solo inducen diabetes cuando son administrados a animales con resistencia a la insulina, o sea, a las RZO y no a las RZL<sup>11</sup>. Con estos datos, para el presente trabajo solo hemos realizado el estudio con las RZO.

Empleamos animales de entre 4 y 6 semanas de edad, con un peso de  $200 \pm 50$  g (Charles-River, Francia). Fueron estabulados en jaulas adecuadas, a 22 °C, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y alimentadas con agua y comida en pellet ad libitum. El comité ético del Hospital Universitario de Canarias aprobó el experimento.

### Diseño experimental

Basado en un estudio previo de nuestro grupo<sup>11</sup>, inducimos la diabetes por TAC en animales obesos y luego reemplazamos el TAC por CsA. Para ello tratamos un grupo de RZO ( $n=44$ ) con TAC durante 11 días para inducir la diabetes, y posteriormente, a día 12, los animales fueron divididos en 2 subgrupos: a) TAC-día12 (grupo de referencia), formado por 22 animales que fueron sometidos a un test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa (TTIPG) y luego sacrificados, y b) TAC-CsA, formado por 22 animales a los que el día 12 de tratamiento se les sustituyó el TAC por CsA durante 5 días, en el día 17 los animales se sometieron a un TTIPG y luego fueron sacrificados. Como grupo control, 45 animales recibieron el vehículo (PBS) durante 12 días; a 23 de ellos se les realizó el TTIPG y fueron sacrificados a día 12, y a 22 se les realizó el TTIPG a día 17 y luego fueron sacrificados (fig. 1).

En nuestro estudio previo<sup>11</sup> todos los animales mostraron diabetes con hiperglucemia severa tras 12 días con TAC, lo que fue revertido con la retirada del fármaco. Además, algunos animales murieron durante el TTIPG a día 12<sup>11</sup> debido a una hiperglucemia severa. De este modo, para el presente estudio consideramos que los animales tratados con TAC durante 12 días tenían ya una diabetes establecida, y por esto no prolongamos el tratamiento con TAC durante 17 días. Para determinar la duración del tratamiento con CsA tras el cambio (TAC-CsA), realizamos análisis preliminares en un subgrupo de animales ( $n=5$ ) en los cuales medimos diariamente los niveles de glucosa en ayunas tras el cambio a CsA. Todos los animales mostraron valores normales de glucosa ( $< 126$  mg/dl) el quinto día tras el cambio a CsA; por tanto, decidimos



**Figura 1 – Esquema temporal del experimento.**

**Los animales fueron tratados con tacrolimus (0,3 mg/kg/día) durante 11 días y aleatoriamente asignados a uno de los siguientes grupos: a) TAC-d12 ( $n=22$ ), sacrificados a día 12, o b) TAC-CsA ( $n=22$ ), tacrolimus fue reemplazado por CsA (2,5 mg/kg/día) durante 5 días. El control no tratado (PBS,  $n=23$ ) recibió PBS por 11 días y sacrificado en el día 12, o recibieron PBS por 17 días (PBS,  $n=22$ ).**

realizar el estudio de la conversión del fármaco a los 5 días de haberse realizado el cambio a CsA.

Los animales tratados con TAC recibieron una inyección intraperitoneal diaria de TAC (0,3 mg/kg/día), y aquellos a los que se les realizó el cambio a CsA recibieron 2,5 mg/kg/día. Las dosis de TAC (0,3 mg/kg/día) y CsA (2,5 mg/kg/día) empleadas fueron determinadas en experimentos previos<sup>11</sup> para obtener los niveles plasmáticos similares a los empleados en la práctica clínica tanto para CsA (200-250 ng/ml) como para TAC (8-10 ng/ml).

Los animales se pesaron diariamente y los niveles de glucosa en ayunas se midieron los días 12, 14 y 17. El día 12 del grupo TAC-d12 ( $n=20$ ) y el día 17 del grupo TAC-CsA ( $n=15$ ), los animales fueron sometidos a un TTIPG con glucosa (2 g/kg) y los niveles de glucosa e insulina se midieron a 0, 30, 60 y 120 min. Los animales con PBS también fueron sometidos al TTIPG los días 12 y 17. Todos los animales fueron sacrificados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg).

El día 12 para los grupos PBS y TAC-d12, así como el día 17 para PBS y TAC-CsA, los páncreas de 10 animales por grupo fueron extraídos para los análisis inmunohistoquímicos y morfométricos. Los páncreas de otros 10 animales de cada grupo fueron extraídos para los análisis de expresión génica de la insulina.

Muestras de suero recogidas de la aorta abdominal fueron obtenidas para medir los niveles de insulina y los parámetros bioquímicos. Las determinaciones bioquímicas se llevaron a cabo en el laboratorio central del Hospital Universitario de Canarias.

### Definiciones

Diabetes: glucemia en ayunas  $\geq 126$  mg/dl o  $> 200$  mg/dl a los 120 min del TTIPG<sup>9</sup>. Prediabetes: glucemia anómala en ayunas: glucosa en ayunas  $\geq 100$  a 125 mg/dl o intolerancia a la glucosa:  $\geq 140$  a 199 mg/dl a 120 min del TTIPG<sup>9</sup>.

### Análisis morfométricos e inmunohistoquímicos

En 10 RZO por grupo de tratamiento a día 17, los páncreas fueron extraídos y fijados durante 24 h en paraformaldehído al 4%

y posteriormente incluidos en parafina. Se realizaron secciones seriadas de 3  $\mu$ m de grosor y se montaron en portaobjetos. Para los análisis morfométricos, los páncreas fueron teñidos con suero antiinsulina de cerdo de guinea y revelado con métodos inmunológicos basados en la biotina-estreptavidina. Se determinó el número de islotes y el área relativa de los mismos en base al área total de páncreas.

La proliferación de la célula  $\beta$  se midió usando el método de incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) (Roche, Suiza). A los animales se les inyectó BrdU (100 mg/kg) 8 h antes del sacrificio. Los páncreas fueron extraídos y procesados como se describió previamente. Las secciones histológicas fueron teñidas con anticuerpos para BrdU e insulina. La proliferación se midió como una estimación del número de células positivas para BrdU en base al número de células positivas para la insulina. Los niveles de apoptosis se midieron con la técnica del TUNEL, llevada a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Cell Death detection kit, POD) (Roche, Suiza). La estimación de células positivas en TUNEL se ajustó al área positiva para insulina. Todas las imágenes fueron tomadas con una cámara Olympus DP72 (Olympus, Tokyo, Japón) acoplada al microscopio Olympus DX41 (Olympus, Tokyo, Japón) y posteriormente analizadas usando el programa ImageJ (National Institute of Health).

#### Extracción del ácido ribonucleico

Los islotes de los animales restantes (n = 10 por tratamiento) fueron aislados de los páncreas mediante digestión con colagenasa<sup>17</sup>. Los islotes usados para el aislamiento de ARN fueron rápidamente congelados en solución D con tiocianato de guanidinio. El ARN total se obtuvo por el método de

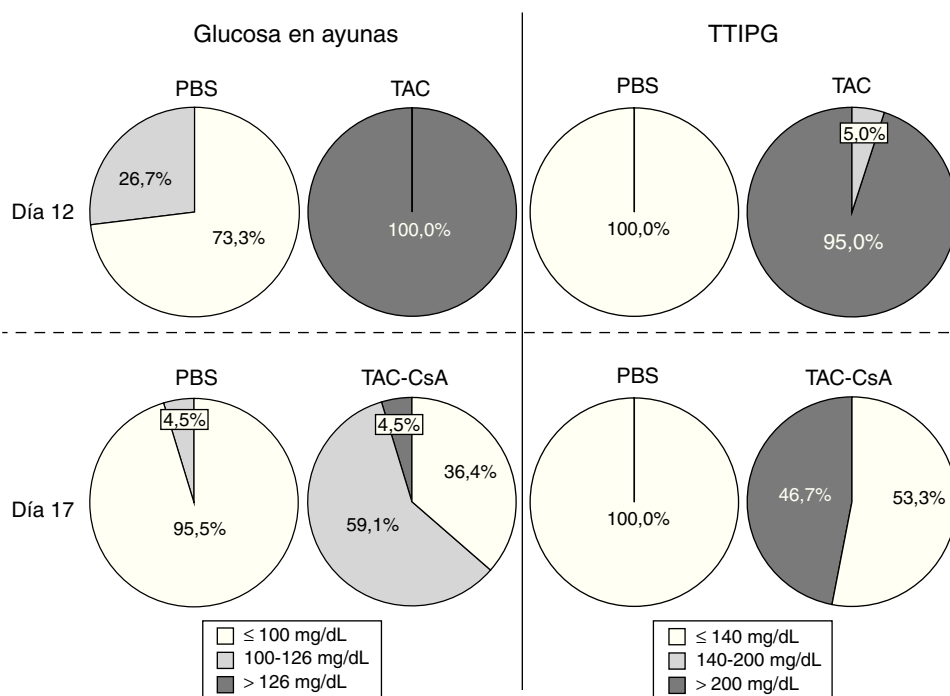
Chomczynski<sup>18</sup>. Determinamos la pureza y la concentración del ARN con Nano-drop 2000 (Thermo-Fisher, Boston, MA, EE. UU.).

#### Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La cuantificación de la abundancia relativa del ARNm de *Ins2* se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa (qPCR) usando SYBR green como método de detección. El ARN total de la muestra fue retrotranscrito usando un kit de síntesis de ADNc (Promega, Madison, WI, EE. UU.) y el ADNc de *Ins2* fue amplificado usando cebadores específicos. La secuencia de los oligonucleótidos empleados fue: 5'-TCATCCTCTGGGAGCCCCGC-3' (cebador con sentido) y 5'-GTTGCAGTAGTTCTCCAGTTGGT-3' (cebador anti sentido). El incremento de la fluorescencia durante la reacción de PCR fue detectado con el sistema iQ5 (Bio-Rad, Hércules, CA, EE. UU.) y la expresión génica fue normalizada con los genes referencia beta-actina y SDHA. Los datos fueron analizados con el programa qBASE<sup>19</sup>.

#### Análisis estadísticos

Las variables continuas son descritas como media y desviación estándar (DE) o mediana y rango intercuartílico cuando es apropiado, las variables dicotómicas se representan con la N y el %. Los grupos fueron comparados usando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y el test de Mann-Whitney según fue necesario. Para los datos de qPCR llevamos a cabo una transformación logarítmica de la expresión génica normalizada, lo que da más simetría a la distribución, atribuyendo igual peso a las condiciones mayor y menor expresión génica<sup>20</sup>.



**Figura 2** – Porcentaje de ratas Zucker obesas con diabetes, prediabetes o sin alteraciones en el metabolismo de la glucosa de acuerdo con las glucemias en ayunas (izquierda) o con un test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa (TTIPG) (derecha) a los 12 y 17 días.

## Resultados

### Homeostasis de la glucosa tras 11 días con tacrolimus

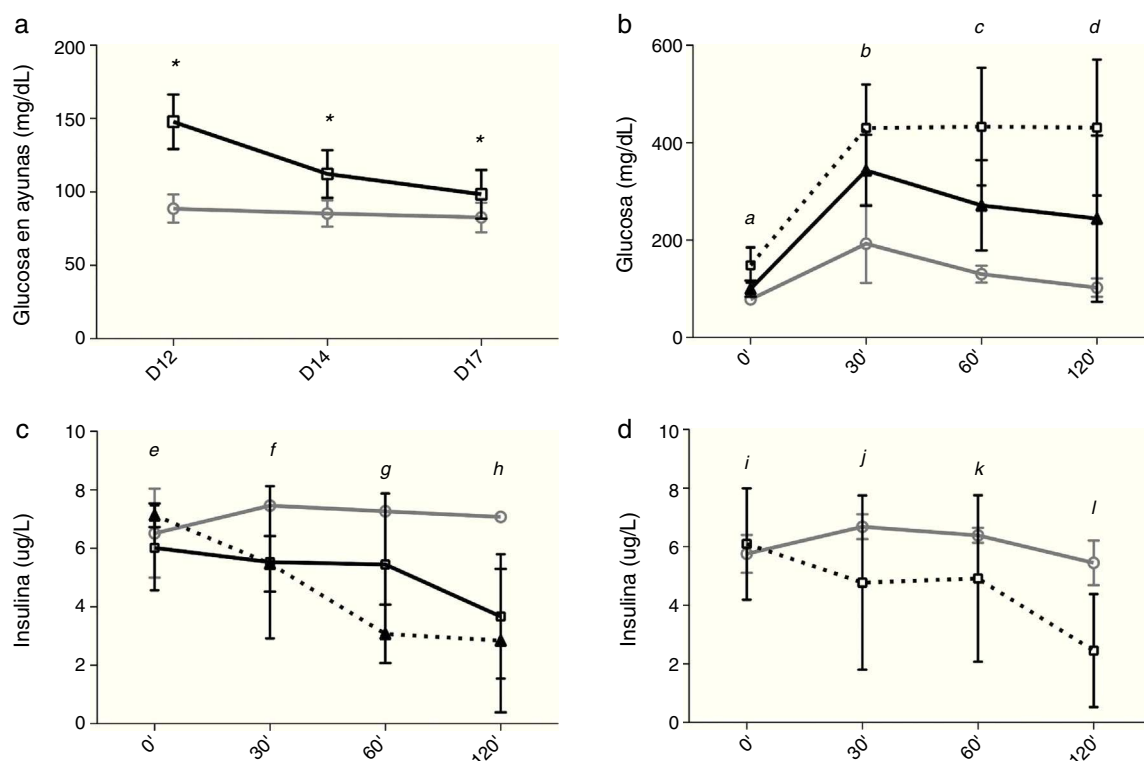
De acuerdo con la glucemia en ayunas, el TAC indujo diabetes en el 100% de los animales a día 12 (fig. 2). Ningún animal con PBS desarrolló diabetes, y solo el 26,7% (12/45) tenían prediabetes (fig. 2). En el día 12, el 95% de los animales con TAC que fueron sometidos al TTIPG (n=20) presentaron niveles de glucosa > 200 mg/dl a los 120 min (fig. 2). Solo un animal tuvo glucemias entre 140 y 200 mg/dl. Ningún animal con PBS presentó diabetes basado en el TTIPG a día 12 (fig. 2).

### Homeostasis de la glucosa tras el cambio de tacrolimus a ciclosporina

Entre los días 12 y 17, tras el cambio de TAC a CsA los niveles de glucosa en ayunas disminuyeron en el grupo TAC-CsA

(fig. 3a) y los niveles de glucosa a día 17 fueron significativamente menores comparados con los del día 12 ( $p < 0.001$ ) (fig. 3a). Basado en los niveles de glucosa en ayunas, en el grupo TAC-CsA solo uno de los 22 animales persistía con diabetes (4,5%), 13 de 22 (59,1%) tenían prediabetes, y 9 de 22 (36,4%) mostraron una glucemia en ayunas normal (fig. 2). Basado en TTIPG, 7 de 15 (46,7%) animales mantenían valores diabéticos (2-h glucosa > 200 mg/dl) en el grupo TAC-CsA, y 8 de 15 (53,3%) mostraron glucemias normales (< 140 mg/dl) a día 17 (fig. 2). En cada punto del TTIPG, los animales del grupo TAC-CsA presentaron mayores niveles de glucosa que los de PBS (fig. 3b) pero menores niveles que aquellos en el grupo TAC-d12 (fig. 3b). Finalmente, los animales con PBS a día 17 mostraron un TTIPG normal (fig. 3b).

Durante el TTIPG del día 17, los animales a los que se les cambió el TAC por CsA no mostraron un incremento en la secreción temprana de insulina (0 a 30 min), pero sí menores niveles de insulina que el grupo con PBS (fig. 3c), siendo



**Figura 3** – Evolución de la glucemia y los niveles de insulina de la RZO.

a) Glucemia en ayunas para PBS (línea gris) y TAC (línea negra). b) Niveles de glucemia y c) niveles de insulina en el TTIPG a día 17. La línea gris corresponde a PBS y la negra a TAC-CsA. Línea negra discontinua, TAC-d12. d) Niveles de insulina durante la TTIPG a día 17 en los animales del grupo TAC-CsA con reversión de la diabetes (línea gris) o con diabetes persistente (línea discontinua).

\* TAC-CsA vs PBS  $p \leq 0,0001$ .

a: todas las comparaciones  $p = 0,0001$ .

b: TAC-CsA o TAC-d12 vs PBS  $p = 0,0001$ ; TAC-CsA vs TAC-d12  $p = 0,005$ .

c: TAC-CsA y TAC-d12 vs PBS  $p = 0,0001$ ; TAC-CsA vs TAC-d12  $p = 0,0001$ .

d: TAC-CsA vs PBS  $p = 0,012$ ; TAC-d12 vs PBS  $p = 0,0001$ ; TAC-d12 vs TAC-CsA  $p = 0,002$ .

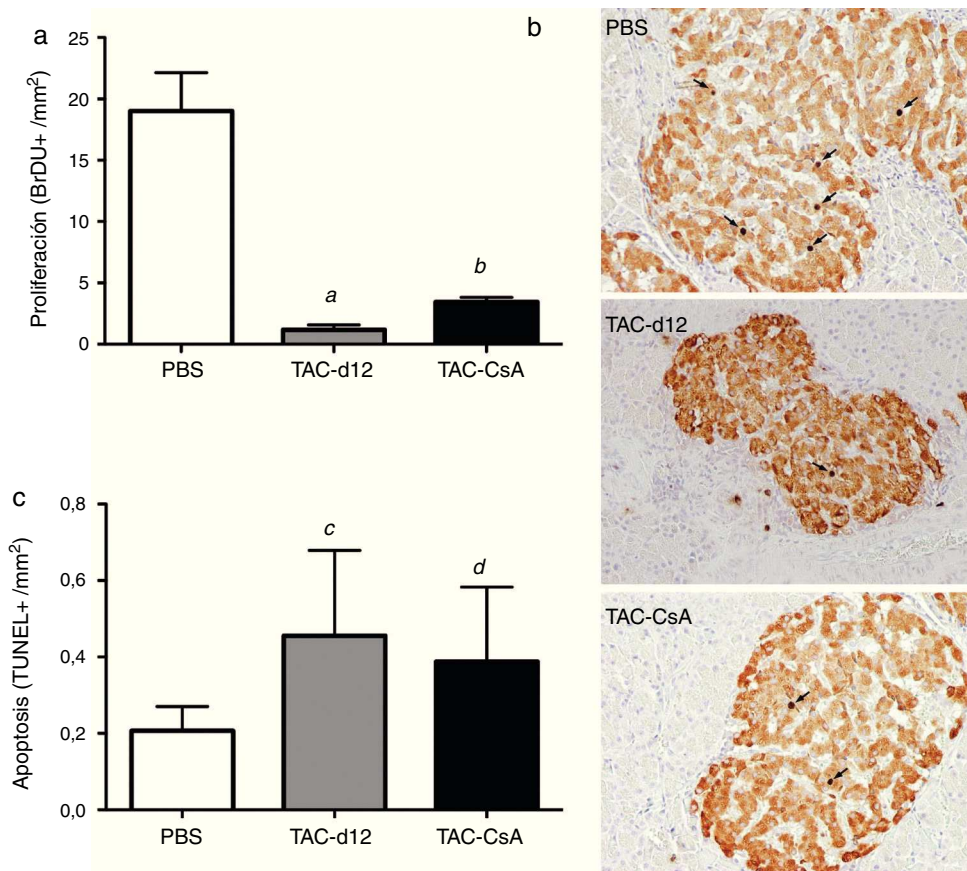
e: TAC-CsA o TAC-d12 vs PBS  $p > 0,05$ ; TAC-d12 vs TAC-CsA  $p = 0,031$ .

f: TAC-CsA vs PBS y vs TAC-CsA  $p > 0,05$ , TAC-d12 vs PBS  $p = 0,033$ .

g: TAC-CsA vs PBS  $p = 0,042$ ; TAC-d12 vs PBS  $p = 0,002$ ; TAC-d12 vs TAC-CsA  $p = 0,011$ .

h: TAC-CsA y TAC-d12 vs PBS  $p \leq 0,0001$ ; TAC-d12 vs TAC-CsA  $p = 0,002$ .

i-l: TAC-CsA-reversión de diabetes vs TAC-CsA-persistencia de diabetes i, j y k:  $p > 0,05$ ; l:  $p = 0,005$ .



**Figura 4** – Proliferación (a) (b) y apoptosis (c) de las células  $\beta$ . Se representa la media  $\pm$  DE. Las flechas (b) muestran los núcleos BrdU positivos para cada uno de los tratamientos.

a: TAC-d12 vs PBS  $p = 0,009$ .

b: TAC-CsA vs PBS  $p = 0,001$  y vs TAC-d12  $p = 0,003$ .

c: TAC-d12 vs PBS  $p = 0,172$ .

d: TAC-CsA vs PBS  $p = 0,311$  y vs TAC-d12  $p = 0,824$ .

comparables a los niveles determinados en el grupo TAC-d12 (fig. 3c). Sin embargo, en un análisis de sensibilidad, la secreción de insulina mejoró en el subgrupo de animales en los que la diabetes revirtió tras el cambio a CsA ( $n = 8$ ), como muestra una tendencia hacia mayores niveles de insulina a los 30 y los 60 min y niveles significativamente superiores a los 120 min, comparado con los animales en los que la diabetes persistió a pesar del cambio a CsA ( $n = 7$ ) (fig. 3d).

Finalmente, en el día 12 los niveles de TAC en el TAC-d12 fueron  $8,37 \pm 3,94$  ng/ml, y a día 17 los niveles de CsA en el grupo TAC-CsA fueron  $508,18 \pm 67,85$  ng/ml, con unos niveles residuales de TAC de  $2,46 \pm 0,90$  ng/ml.

#### Proliferación de la célula beta pancreática, apoptosis y expresión génica de la insulina tras 11 días con tacrolimus y tras el cambio a ciclosporina

La cuantificación con bromodeoxiuridina en las células positivas para insulina indicó una menor proliferación en el grupo TAC-d12 tras 11 días de tratamiento que en el grupo con PBS ( $p = 0,009$ ) (fig. 4a). Al comparar el cambio de TAC a CsA (TAC-CsA) con el grupo TAC-d12, la tasa proliferativa de las células  $\beta$

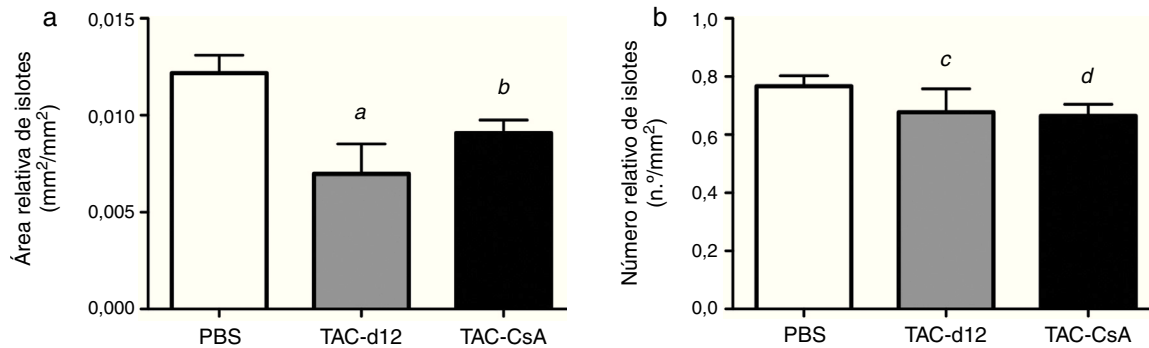
mejoró significativamente ( $p = 0,003$ ) (fig. 4a). No se apreciaron diferencias en la apoptosis entre ambos grupos (fig. 4c).

El área relativa de islote fue también menor en el grupo TAC-d12 al compararlo con el de PBS ( $p = 0,011$ ) (fig. 5), pero no hubo diferencias con el TAC-CsA. No se apreciaron diferencias en el número relativo de islotes para ninguno de los grupos.

Once días con tacrolimus (TAC-d12) redujo la expresión del gen *Ins2* significativamente con respecto al grupo con PBS ( $p \leq 0,0001$ ) (fig. 6). Tras 5 días del cambio a CsA (TAC-CsA), la expresión del gen *Ins2* volvió a valores comparables a los de PBS ( $p = 0,755$ ) y se incrementó significativamente con respecto a TAC-d12 ( $p \leq 0,0001$ ) (fig. 6).

#### Discusión

En este modelo de diabetes inducida por tacrolimus en animales con resistencia a la insulina hemos observado que el cambio a ciclosporina-A conduce a: 1) una mejora de los niveles de glucemia, tanto en ayunas como durante el TTIPG; 2) la reversión de la diabetes en el 53,3% de los animales; 3) un mejora en la proliferación de las células  $\beta$ , y finalmente 4) un aumento en la expresión génica de la insulina.



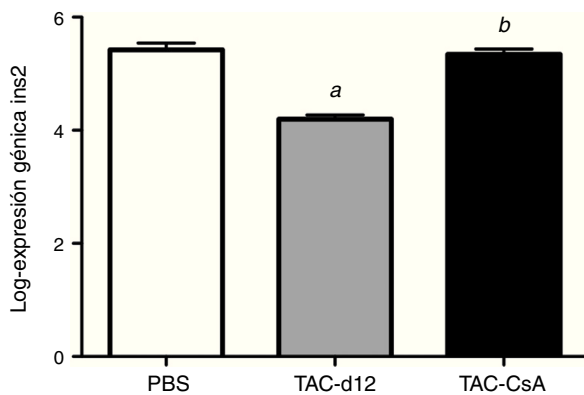
**Figura 5** – Morfometría de los islotes de RZO tratadas con PBS o TAC durante 11 días (TAC-d12) o TAC durante 11 días con cambio a CsA (TAC-CsA) durante 5 días ( $n = 10$  por tratamiento). a) Área de islotes ajustada por el área total de páncreas. b) Número de islotes ajustado por milímetros cuadrados de páncreas. Se representa la media  $\pm$  DE.

a: TAC-d12 vs PBS  $p = 0,011$ .

b: TAC-CsA vs PBS  $p = 0,016$  y vs TAC-d12  $p = 0,197$ .

c: TAC-d12 vs PBS  $p = 0,523$ .

d: TAC-CsA vs PBS  $p = 0,078$  y vs TAC-d12  $p = 0,892$ .



**Figura 6** – Expresión del gen *Ins2* en RZO con PBS o TAC durante 11 días (TAC-d12) o TAC durante 11 días con cambio a CsA (TAC-CsA) durante 5 días ( $n = 10$  por tratamiento). Se representa la media  $\pm$  DE.

a: TAC-d12 vs PBS  $p \leq 0,0001$ .

b: TAC-CsA vs PBS  $p = 0,755$  y vs TAC-d12  $p \leq 0,0001$ .

La rata Zucker obesa (RZO) es un modelo conocido de resistencia a la insulina. Hemos observado previamente que en las RZO, el mayor efecto diabetógeno de TAC comparado al de CsA es determinado por la resistencia a la insulina<sup>11</sup>. Para el presente estudio, cuyo objetivo fue comprender mejor los mecanismos de la reversión de la DMPT, usamos RZO en lugar de modelos animales insulina-sensibles como pueden ser Sprague Dawley, Wistar, o RZL. Hemos confirmado nuestro hallazgos previos, en los que la administración de TAC durante 11 días inducía diabetes en el 100% de los animales insulino-resistentes diagnosticada bien por glucemia en ayunas o por TTIPG (figs. 2 y 3).

Nuestro principal hallazgo es que, en la diabetes inducida por TAC, el cambio a CsA conduce a una mejoría en el metabolismo de la glucosa y a la reversibilidad de la diabetes en el 50% de los animales (fig. 2). Esta reversibilidad se observó solo

5 días después del cambio a CsA (fig. 3a,b). Sin embargo, no fue completa, ya que el 59,1% de los animales mostraron niveles de glucemia dentro del rango de la prediabetes (por glucemia basal en ayunas), y en el 46,7% la diabetes persistió según los resultados del TTIPG (glucemia a 120 min  $> 200$  mg/dl) (fig. 2). De este modo, los cambios en la homeostasis de la glucosa, aunque relevantes si se comparan con la diabetes establecida en el grupo de TAC, no representaron la reversibilidad total de la diabetes inducida por el fármaco.

Las causas de la mejoría en el metabolismo de la glucosa tras sustituir el TAC por CsA no están claras, pero podrían estar en parte relacionadas con un incremento en la proliferación de la célula  $\beta$  (fig. 4). Hemos observado previamente que el TAC es más potente inhibidor de la proliferación de la célula  $\beta$  que la CsA<sup>11</sup>. Con esto, es plausible que la sustitución de un potente inhibidor de la proliferación (TAC) por uno menos potente (CsA) ayude a la célula  $\beta$  a recuperar en cierta medida su capacidad proliferativa y, en consecuencia, a manejar mejor la hiperglucemia. Hoy en día, las células  $\beta$  son consideradas más resistentes al daño de lo que antes se pensaba, con una alta capacidad de recuperación frente a un ambiente tóxico<sup>21</sup>. En nuestro trabajo resulta especialmente llamativa la reducción en el área media de islotes pancreáticos tras 11 días de tratamiento con TAC, la cual no se corresponde con un aumento equivalente en la apoptosis de la célula  $\beta$ . En este aspecto, se han hecho numerosos esfuerzos para determinar los mecanismos que hacen que haya un descenso en la función y en el número de células  $\beta$  en los enfermos con diabetes mellitus tipo 2. Nuevas evidencias sugieren que estos cambios podrían deberse a procesos de desdiferenciación o transdiferenciación en estas células, y no a procesos de apoptosis, lo que sugiere un nuevo concepto en la patogénesis de la disfunción de la célula  $\beta$ <sup>22</sup>. Estas nuevas hipótesis estarían en consonancia con nuestro modelo, en el que se observa la pérdida de un marcador de identidad de la célula  $\beta$  como es la insulina, pero por el contrario no se aprecia un aumento en la apoptosis. Además, la pronta recuperación observada tras el cambio del fármaco, así como ya habíamos observado

previamente con su retirada<sup>11</sup>, apoyan la idea de una pérdida de función e identidad de la célula  $\beta$  más que de un proceso de muerte celular. En cualquier caso, son necesarios futuros experimentos para confirmar estas hipótesis en este modelo de diabetes inducida por ICN.

También hemos observado en estudios previos que el TAC es un inhibidor más potente de la expresión del gen *Ins2* que la CsA<sup>11</sup>. Según estos datos, la expresión del gen *Ins2* (homólogo al gen de la proinsulina humana) tras 11 días de exposición a TAC (TAC-d12) fue significativamente más baja que en los animales que recibieron solo el vehículo (PBS) durante 17 días (fig. 6). El incremento en la expresión del gen *Ins2* después del cambio a CsA fue significativamente superior cuando se comparó con el grupo al que solo se le administró TAC ( $p \leq 0,0001$  vs. TAC-d12), lo cual sugiere que una mejoría en la expresión del gen *Ins2* podría estar relacionada con el mejor manejo de la glucosa tras el cambio a CsA.

Los mecanismos moleculares involucrados en el incremento de la proliferación de la célula  $\beta$  asociados al cambio de TAC a CsA son, hasta donde llega nuestro conocimiento, desconocidos. El hecho de que el TAC sea un inhibidor más potente de la calcineurina que la CsA<sup>23</sup> podría explicar el mayor impacto del primero en la disminución de factores de transcripción dependientes de la calcineurina, como pueden ser el factor nuclear de las células T (NFAT), el elemento de respuesta al cAMP (CREB) y el transductor de CREB (TORC2), los cuales resultan cruciales para la proliferación de la célula  $\beta$ <sup>24-26</sup>.

Nuestros resultados son consistentes con los pocos estudios retrospectivos realizados en humanos<sup>10</sup>. Ghisdal et al.<sup>10</sup> observaron un 42% de reversibilidad de la DMPT con el cambio de TAC a CsA en 34 pacientes y un 0% en 20 pacientes que continuaron con TAC. En este trabajo los autores también citaron otro estudio clínico con similares hallazgos. Sin embargo, estos trabajos presentan un diseño post hoc y un bajo poder estadístico para probar eficacia y seguridad. El presente trabajo en animales con resistencia a la insulina provee información sobre los mecanismos y la manera en que la mejoría del metabolismo de la glucosa se asocia a un temprano cambio a CsA, una vez que la diabetes inducida por TAC está establecida. Serán necesarios futuros ensayos clínicos para poder establecer el papel que esta estrategia puede tener a la hora de minimizar el daño producido a la célula  $\beta$  en el establecimiento de la DMPT.

Nuestro estudio tiene limitaciones. La primera de ellas es la aplicación de los datos obtenidos en un modelo animal a la investigación clínica. Sin embargo, las coincidencias entre este trabajo y los trabajos retrospectivos publicados en humanos<sup>10</sup> podrían indicar la utilidad de este modelo animal para el estudio del impacto del cambio de TAC a CsA en el metabolismo de la glucosa y en la biología de la célula  $\beta$ . La segunda limitación hace referencia a la aplicación de criterios humanos como prediabetes y diabetes en un modelo animal. Sin embargo, esto es un estándar en investigación básica<sup>26-29</sup>, y hasta donde sabemos no hay un consenso claro para estas definiciones en roedores. Otra limitación está relacionada con el hecho de la duración del cambio; 5 días de cambio a CsA podrían ser pocos, pero con ellos los niveles de glucosa en ayunas a día 17 mostraron mejoras significativas. Además, nuestros resultados muestran que se trata de tiempo suficiente para diluir el

efecto tóxico del TAC y, por tanto, descartar la posibilidad de un efecto acumulativo de ambos fármacos en la célula  $\beta$ . El efecto que pueda tener en la homeostasis de la glucosa una exposición más larga a CsA debe ser establecido en el futuro. En el presente estudio utilizamos niveles relativamente elevados de CsA, lo que pudo haber incrementado el riesgo de diabetes en animales que recibieron esta medicación. Sin embargo, el uso de niveles más bajos solo podría haber incrementado las diferencias con el grupo de TAC. Por último, en este modelo animal la diabetes ha sido establecida tras un corto periodo de exposición al fármaco y el experimento no fue diseñado para evaluar la reversibilidad de la diabetes tras un largo periodo, lo cual debe ser investigado.

En resumen, podemos concluir que en la diabetes inducida por TAC el cambio a ciclosporina mejora la homeostasis de la glucosa, lo cual está relacionado con un incremento en la proliferación de la célula  $\beta$  y posiblemente con un incremento en la expresión del gen de la insulina. La evaluación ad hoc de este efecto en pacientes con DMPT debe ser estudiada.

## Financiación

Los autores quieren agradecer al proyecto IMBRAIN (FP7-RE6-POT-2012-CT2012-31637-IMBRAIN), fundado bajo el 7.º Frameworks Programme. Agradecen al Instituto de Salud Carlos III (Fondo de Investigación Sanitaria: FIS) por las siguientes financiaciones: PI 07/0732, REDINREN RD/0021/0008 y PI10/02428. También agradecemos los fondos del IRSIN (Instituto Reina Sofía de Investigación) y Fondos FEDER.

## Conflicto de intereses

Ninguno de los autores presenta conflicto de intereses en lo referente al presente trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Shapiro R, Young JB, Milford EL, Trotter JF, Bustami RT, Leichtman AB. Immunosuppression: Evolution in practice and trends, 1993-2003. *Am J Transplant.* 2005;5 4 Pt 2:874-86.
- Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, Gürkan A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med.* 2007;20:2562-75.
- Yates C, Furlanos S, Hjelmæsæth J, Colman P, Cohnen S. New-onset diabetes after kidney transplantation-changes and challenges. *Am J Transplant.* 2012;12:820-8.
- Delgado P, Diaz JM, Silva I, Osorio JM, Osuna A, Bayés B, et al. Unmasking glucose metabolism alterations in stable renal transplant recipients: A multicenter study. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3:808-13.
- Porrini E, Moreno JM, Osuna A, Benitez R, Lampreabe I, Diaz JM, et al. Prediabetes in patients receiving tacrolimus in the first year after kidney transplantation: A prospective and multicenter study. *Transplantation.* 2008;85:1133-8.
- Valderhaug TG, Hjelmæsæth J, Rollag H, Leivestad T, Røislien J, Jenssen T, et al. Reduced incidence of new-onset post-transplantation diabetes mellitus during the last decade. *Transplantation.* 2007;84:1125-30.
- Valderhaug TG, Hjelmæsæth J, Hartmann A, Røislien J, Bergrem HA, Leivestad T, et al. The association of early



- post-transplant glucose levels with long-term mortality. *Diabetologia*. 2011;54:1341-9.
8. Woodward RS, Schnitzler MA, Baty J, Lowell JA, Lopez-Rocafor L, Haider S, et al. Incidence and cost of new onset diabetes mellitus among U.S. wait-listed and transplanted renal allograft recipients. *Am J Transplant*. 2003;3:590-8.
  9. Davidson J, Wilkinson A, Dantal J, Dotta F, Haller H, Hernández D, et al. International Expert Panel. New-onset diabetes after transplantation: 2003 International consensus guidelines. *Proceedings of an international expert panel meeting. Transplantation*. 2003;27(75):SS3-24.
  10. Ghisdal L, Bouchta NB, Broeders N, Crenier L, Hoang AD, Abramowicz D, et al. Conversion from tacrolimus to cyclosporine A for new-onset diabetes after transplantation: A single-centre experience in renal transplanted patients and review of the literature. *Transplant Int*. 2008;21:146-51.
  11. Rodriguez-Rodriguez AE, Triñanes J, Velazquez-Garcia S, Porrini E, Vega Prieto MJ, Diez Fuentes ML, et al. The higher diabetogenic risk of tacrolimus depends on pre-existing insulin resistance. A study in obese and lean Zucker rats. *Am J Transplant*. 2013;13:1665-75.
  12. Zucker LM, Zucker TF. Fatty, a new mutation in the rat. *J Hered*. 1961;52:275-8.
  13. Phillips MS, Liu Q, Mammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, et al. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet*. 1996;13:18-9.
  14. Ionescu E, Sauter JF, Jeanrenaud B. Abnormal oral glucose tolerance test in genetically obese (fa/fa) rats. *Am J Physiol Endoc M*. 1985;248:E500-6.
  15. Stern J, Johnson PR, Greenwood MR, Zucker LM, Hirsch J. Insulin resistance and pancreatic insulin release in the genetically obese Zucker rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1972;139:66-9.
  16. Curry D, Stern J. Dynamics of insulin hypersecretion by obese Zucker rats. *Metabolism*. 1985;34:791-6.
  17. Garcia-Ocaña A, Takane KK, Syed MA, Philbrick WM, VasavadaRC, Stewart AF. Hepatocyte growth factor overexpression in the islet of transgenic mice increases beta cell proliferation, enhances islet mass, and induces mild hypoglycemia. *J Biol Chem*. 2000;275:1226-32.
  18. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-9.
  19. Hellemans J, Mortier G, de Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBASE relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*. 2007; 8:R19.
  20. Willems E, Leyns L, Vandesompele J. Standardization of real time PCR gene expression data from independent biological replicates. *Anal Biochem*. 2008;2379:127-9.
  21. Cerf M. Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology*. 2013;4:37.
  22. Spijker HS, Ravelli RB, Mommaas-Kienhuis AM, Van Apeldoorn AA, Engelse MA, Zaldumbide A, et al. Conversion of mature human  $\beta$ -cells into glucagon-producing  $\alpha$ -cells. *Diabetes*. 2013;7:2471-80.
  23. Morris R. Modes of action of FK506, cyclosporin A and rapamycin. *Transplant Proc*. 1994;6:1272-5.
  24. Chakkeri HA, Mandarino LJ. Calcineurin inhibition and new-onset diabetes mellitus after transplantation. *Transplantation*. 2013;15:647-52.
  25. Heit JJ. Calcineurin/NFAT signalling in the beta cell: From diabetes to new therapeutics. *Bioessays*. 2007;10:1011-21.
  26. Soleimanpour SA, Crutchlow MF, Ferrari AM, Raum JC, Groff DN, Rankin MM, et al. Calcineurin signaling regulates human islet survival. *JBC*. 2010;285:40050-9.
  27. Chentouf M, Dubois G, Jahannaut C, Castex F, Lajoix AD, Gross R, et al. Excessive food intake, obesity and inflammation process in Zucker fa/fa rat pancreatic islets. *PLoS ONE*. 2011;6:e22954.
  28. Chowdhury KK, Legare DJ, Lutt WW. Exercise enhancement of hepatic insulin-sensitizing substance-mediated glucose uptake in diet induced prediabetic rats. *Br J Nutr*. 2012;109:844-52.
  29. Movassat J, Bailbé D, Lubrano-Berthelie C, Picarel-Blanchot F, Bertin E, Mourot J, et al. Follow-up of GK rats during prediabetes highlights increased insulin action and fat deposition despite low insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294:E168-75.