

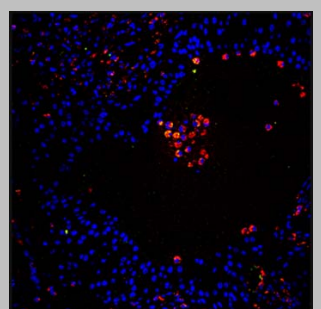
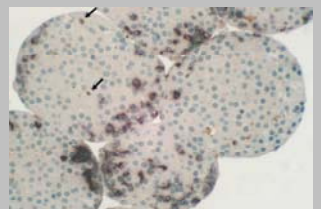
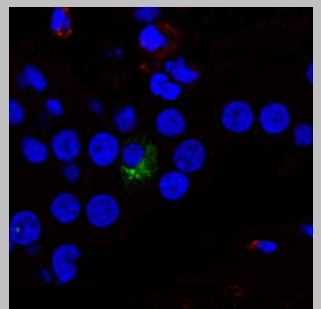
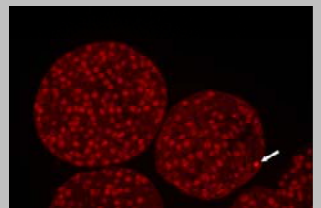
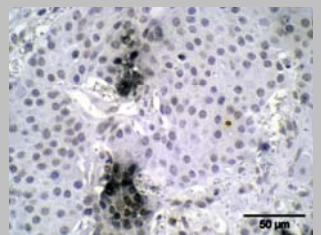
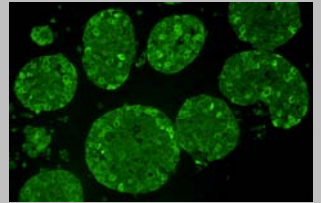
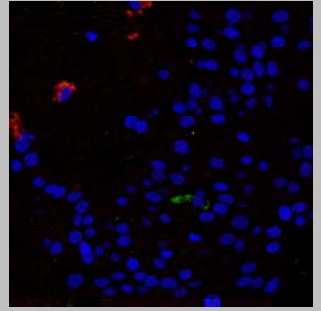
UNIVERSITAT DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES CLÍNiques

LESIÓ I PROTECCIÓ DE LES CÈL·LULES BETA EN EL
TRASPLANTAMENT D'ILLOTS PANCREÀTICS

Marta Montolio Rusiñol

2006



DISCUSSION

Els illots trasplantats són força vulnerables, especialment durant els primers dies després del trasplantament. És durant aquests primers moments quan es produeix una important pèrdua de la massa beta trasplantada que repercuteix en la fallida del trasplantament. En aquest estudi hem comprovat la presència d'una reacció inflamatòria inespecífica en la zona d'implantació dels illots pancreàtics. Hem detectat l'expressió de gens de citocines inflamatòries, com són la IL-1 β , el TNF- α , la IL-6 i la IL-10. L'expressió d'aquests gens augmenta de manera molt important el primer dia després del trasplantament i, tot i que més tard, en els dies 3 i 7 disminueix, en la majoria dels casos segueix sent superior a la detectada en els illots acabats d'aïllar i en els illots en cultiu. Aquesta resposta inflamatòria es troba augmentada en els receptors diabètics, els quals presenten una major expressió de TNF- α , IL-6 i IL-10 que la detectada en els receptors normoglicèmics. Aquesta reacció inflamatòria inespecífica podria jugar un paper important en la disfunció i mort de les cèl·lules trasplantades. Una reducció d'aquesta mort inicial podria millorar el pronòstic de l'empelt. En aquest sentit, hem demostrat que un inhibidor de la mort per apoptosi disminueix la mort produïda per citocines en els illots en cultiu i també en els illots trasplantats. Aquesta reducció de la mort per apoptosi en l'empelt dels primers dies després del trasplantament es correspon amb una millor evolució metabòlica del receptor del trasplantament.

En el trasplantament d'illots, el fet que un empelt no arribi a ser funcional i fracassi abans que es produeixi el rebuig és conegut com a pèrdua de la funció primària (en anglès, *primary non-function*). La manca de funcionalitat de l'empelt es pot produir tant per problemes en la funció beta com per la pèrdua de les cèl·lules beta (Berney T i col., 2001). Aquest fet ha estat descrit tant en trasplantament d'illots al·logènics com singènics (Nagata M i col., 1990), indicant que els fenòmens involucrats en aquesta pèrdua de funció primària són diferents del rebuig i de l'autoimmunitat. El mecanisme per el qual es produeix és probablement multifactorial i, tot i que els mediadors de la mort de les cèl·lules beta en l'inici del trasplantament no són ben coneguts, se sap que després del trasplantament es produeix una resposta inflamatòria que comporta la producció de mediadors proinflamatoris. S'ha proposat que les citocines inflamatòries tindrien un paper important en aquesta inflamació inespecífica (Ricordi C i Inverardi L, 2000).

D'altra banda, és ben conegut que la condició metabòlica del receptor modifica el pronòstic de l'empelt. En els empelts d'illots exposats a hiperglicèmia sostinguda, les cèl·lules beta presenten una disminució de la seva funció (Korsgren O i col., 1989; Warnock GL i col., 1990; Jansson L i col., 1995), una limitada capacitat de la replicació, un augment de l'apoptosi (Biarnés M i col., 2002), una reducció de la seva massa (Eizirik DL i col., 1997; Montaña E i col., 1993) i s'ha descrit com la normoglicèmia aconseguïda amb insulina exògena en ratolins

diabètics té un efecte beneficiós sobre els illots trasplantats tant en el cas del trasplantament singènic com l'al·logènic (Merino JF i col., 1997; Ferrer-Garcia JC i col., 2003). La normogluccèmia fa disminuir el nombre d'illots necessaris per curar la diabetis en els animals trasplantats i, mentre que en un ratolí hipergluccèmic calen 300 illots per restablir la normogluccèmia, en els animals tractats amb insulina des d'abans del trasplantament fins els 14 dies posteriors al trasplantament, es curen amb 100. En els illots trasplantats a receptors normogluccèmics s'observa que la funció de les cèl·lules beta està mantinguda (presenten un mateix contingut d'insulina corregit per la massa beta que els illots no trasplantats i el test de tolerància a la glucosa és normal), mentre que en els trasplantats a receptors hipergluccèmics la funció de les cèl·lules està danyada (Merino JF i col., 1997). De totes maneres, no ha estat determinat si l'exposició a la hipergluccèmia dels illots trasplantats pot modificar la inflamació inespecífica que es produeix en l'empelt durant els primers dies després del trasplantament.

Aquestes dades ens van conduir a estudiar la presència de citocines inflamatòries en empelts dels primers dies després del trasplantament, així com si la hipergluccèmia tenia un efecte sobre l'expressió d'aquestes citocines. Per fer-ho es van trasplantar 500 illots singènics sota la càpsula renal de rates Lewis diabètiques o normogluccèmiques. Es va analitzar l'expressió de citocines inflamatòries en els empelts extrets els dies 1, 3 i 7 després del trasplantament. L'estudi es va fer en un model de trasplantament singènic per poder descartar la participació del rebuig en aquests fenòmens.

En estudis d'altres grups s'havia vist que l'activitat endotoxina present en les preparacions de la col·lagenasa emprada per a l'obtenció dels illots provoca una resposta inflamatòria que pot ser la responsable de la inducció de l'expressió dels gens de les diferents citocines proinflamatòries durant el procés d'aïllament (Vargas F i col., 1998). Així doncs, l'expressió de citocines que vam trobar en els primers dies després del trasplantament, i en particular el dia 1, podia ser un reflex de la inflamació induïda per l'endotoxina durant l'aïllament dels illots. Per tal de poder discernir entre la contribució de l'aïllament i la del trasplantament sobre l'expressió de citocines en l'empelt, es van incloure en l'estudi un grup d'illots aïllats immediatament després del trasplantament i un altre d'illots cultivats durant 24 h. Si l'expressió de citocines en els illots acabats d'aïllar o en els cultivats era igual o superior que en els empelts ens indicaria que el procés del trasplantament dels illots estaria influïnt poc en l'expressió de les citocines inflamatòries en l'empelt i que l'endotoxina seria la màxima responsable. Però l'expressió de citocines es trobava augmentada en els empelts, suggerint que l'endotoxina no era l'única responsable de la inflamació que es va trobar en els primers dies després del trasplantament.

L'efecte del trasplantament va ser particularment important sobre l'expressió de la IL-1 β i del TNF- α . Aquestes dues citocines van mostrar una expressió molt més alta en els empelts que en els illots acabats d'aïllar o en els cultivats. En canvi, l'efecte del trasplantament sobre la IL-6 i la IL-10 va ser més moderat. L'expressió d'aquestes dues citocines ja estava augmentada en els illots en cultiu quan es comparava amb els illots immediatament després de l'aïllament i l'augment de la seva expressió després del trasplantament va ser menys acusat. Es coneix bé la implicació de l'activitat endotoxina sobre l'expressió de les citocines proinflamatòries (com per exemple, la producció de IL-1, IL-6 i TNF- α en illots humans durant l'aïllament induïda per l'activitat endotoxina de la col·lagenasa (Vargas F i col., 1998)). D'aquesta manera, es va pensar que l'endotoxina present en la col·lagenasa que s'utilitza per a l'aïllament dels illots podria ser la responsable de l'augment de les citocines i per això es va usar un mateix lot de col·lagenasa per a tot l'estudi. Tot i així, la variabilitat que es va detectar en l'expressió de les citocines entre els illots de diferents aïllaments, porta a considerar que a més a més de l'exposició a endotoxina durant l'aïllament, en l'empelt hi ha d'altres factors que contribueixen a produir la inflamació que es detecta durant els primers dies després del trasplantament.

En els empelts es va trobar una molt alta expressió d'IL-1 β , especialment en el dia 1 després del trasplantament i, tot i que en els empelts dels dies 3 i 7 l'expressió d'IL-1 β havia disminuït, se seguia mantenint superior a la dels illots frescos i la dels els illots cultivats. Aquest fet és particularment rellevant donat els importants efectes deleteris que té la IL-1 β sobre les cèl·lules beta. La IL-1 β danya la funció, indueix la mort i inhibeix la replicació de la cèl·lula beta (Sjöholm Å, 1991; Eizirik DL i col., 1990; Téllez N i col., 2005). A més a més, s'ha demostrat que la IL-1 β pot induir la producció de TNF- α en les cèl·lules beta (Yamada K i col., 1993), amb la qual cosa es podria estar amplificant la resposta inflamatòria en els empelts. No es van observar canvis en l'expressió de IL-1 β entre els grups normoglicèmics i hiperglicèmics, indicant que, en aquest cas la hiperglicèmia no estaria modificant la seva expressió.

Aquestes dades estarien en desacord amb estudis fets en illots humans exposats a altes concentracions de glucosa en els quals es detecta un augment de l'expressió, síntesi i secreció de IL-1 β (Maedler K i col., 2002). Aquest mateix grup també mostrà la presència de IL-1 β en pàncrees de diabètics de tipus 2 i en els illots de pàncrees de *Psammomys obesus* (rata de sorra diürna que és un model animal emprat per l'estudi de la diabetis mellitus de tipus 2) alimentat amb una dieta hipercalòrica durant uns quants dies (Maedler K i col., 2002). Les discrepàncies entre els nostres resultats, obtinguts amb el trasplantament d'illots de rata, i els estudis fets amb els illots de *P. obesus* i amb els illots humans es podrien explicar per la diferència en el model d'estudi, per les diferents condicions en què es realitzen els experiments i per les diferències d'espècie. Tot i això,

els nostres resultats concorden amb d'altres dades prèvies descrites en illots de rosegadors (Elouil H i col., 2005) i també recentment, en illots humans, que indiquen que les altes concentracions de glucosa no estimulen l'expressió de IL-1 β (Welsh N i col., 2005). En aquest últim estudi en illots humans es mesurà la presència de la IL-1 β en els illots utilitzant la PCR quantitativa a temps real (de la mateixa manera que nosaltres) tant en illots cultivats a altes dosis de glucosa com en illots aïllats de pacients diabètics de tipus 2; mentre que en l'estudi de Maedler K i col. (2002) la mesura es fa amb un assaig comercial d'ELISA. Tot i els resultats que hem obtingut, no es pot descartar que la hiperglucèmia estigui modificant la sensibilitat dels illots als efectes deleteris de la IL-1 β en rata tal i com ha estat descrit en d'altres estudis realitzats amb cèl·lules beta de rata purificades i també amb illots de rata (Ling Z i col., 1998; Spinas GA i col., 1988). En una població heterogènia de cèl·lules beta (heterogènia en quant a la secreció d'insulina en resposta a la glucosa) s'observa que les cèl·lules amb una millor resposta a la glucosa són més sensibles als efectes deleteris que provoca la IL-1 β sobre la funció de les cèl·lules beta. Si les cèl·lules beta que no responen a glucosa s'activen amb altes concentracions de glucosa durant uns quant dies, passen a ser igualment sensibles als efectes deleteris de la IL-1 β (Ling Z i col., 1998). En illots de rata es pot observar com els efectes de la IL-1 β sobre la secreció d'insulina depenen tant de la durada de l'exposició com la dosi de IL-1 β , a més a més de la concentració de glucosa de l'ambient (Spinas GA i col., 1988). Així doncs, no podem descartar que la hiperglucèmia estigui potenciant els efectes deleteris que pugui tenir la IL-1 β sobre la funció dels illots trasplantats.

L'expressió del gen de TNF- α es va detectar en els illots aïllats, en concordança amb dades prèvies on s'havia determinat l'expressió de TNF- α en illots de rosegadors i d'humans (Berney T i col., 2001; Vargas F i col., 1998), i va augmentar en els illots trasplantats. En un estudi previ sobre l'expressió de citocines en empelts al·logènics i singènics no s'havia pogut detectar TNF- α (Ozasa T i col., 1997). L'augment de TNF- α podria ser important compromentent la supervivència de l'empelt ja que TNF- α té efectes deleteris sobre la supervivència dels illots com ho mostra que la seva presència sigui la que iniciï la diabetis mellitus de tipus 1 en un model de ratolins NOD mitjançant l'activació de la maduració de les cèl·lules dendrítiques i l'activació de la resposta immune (Lee LF i col., 2005), o que illots de ratolí exposats a altes concentracions de TNF- α i IFN- γ presentin una disminució de la secreció d'insulina en resposta a glucosa així com la destrucció de les cèl·lules de l'illot en 6 dies de cultiu (Campbell IL i col., 1988). Els efectes són més acusats encara quan la combinació que s'usa és la de les tres citocines proinflamàtores (IL-1 β + TNF- α + IFN- γ) (Liu D i col., 2000). També està descrit que el TNF- α estimula la producció de IL-6 en els illots pancreàtics (Campbell IL i col., 1989), la qual cosa faria augmentar encara més la resposta inflamatòria en els empelts d'illots.

L'acció de IL-6 depèn del tipus cel·lular, i en els illots de rata han estat descrites tant una acció protectora (Choi S-E i col., 2004) com perjudicial (Southern C i col., 1990; Wadt KAW i col., 1998). Per una banda, illots de ratolí incubats amb IL-6 presenten una millor viabilitat quan després són exposats a una combinació de citocines proinflamàtores (IL-1 β + TNF- α + IFN- γ), i també sobreviuen per més temps quan són trasplantats (Choi S-E i col., 2004). D'altra banda, ha estat descrit també que la IL-6 inhibeix la secreció d'insulina induïda per glucosa en els illots de rata de manera similar a la IL-1 β (Southern C i col., 1990) o, fins i tot, que potencia la inhibició produïda per la IL-1 β (Wadt KAW i col., 1998). En el nostre cas, l'expressió de la IL-6 es va detectar en els illots en cultiu però no en els illots frescos, i el dia 1 després del trasplantament va augmentar exclusivament en el grup hiperglucèmic. Que hi hagués uns nivells d'expressió similars en els illots en cultiu i en els empelts normoglucèmics de dia 1 suggereix que aquest augment d'expressió era degut al procés d'obtenció dels illots. Que en els empelts normoglucèmics de dia 3 i 7 després del trasplantament els nivells d'expressió de IL-6 fossin, fins i tot, inferiors als dels illots en cultiu recolza aquesta idea. Aquests resultats demostren que el trasplantament té un efecte menor en l'expressió de IL-6 que sobre l'expressió de IL-1 β o TNF- α , però que l'exposició a la hiperglucèmia, en aquest cas, fa augmentar la presència de IL-6 en el primer dia després del trasplantament. La hiperglucèmia també fa que els nivells de la IL-6 en els dies posteriors es mantinguin igualment elevats, mentre que la normoglucèmia permet que els nivells d'aquesta citocina disminueixin per sota dels nivells que es troben en els illots en cultiu.

En el cas d'IFN- γ , la detecció només va ser possible en algun dels empelts i a cicles molt tardans de la PCR, amb la qual cosa va ser inquantificable. Les nostres dades concorden amb d'altres estudis on es detectà l'expressió d'IFN- γ en el trasplantament d'illots al·logènics, però no es detectà o era pràcticament indetectable en els empelts d'illots singènics (Ozasa T i col., 1997; Cardozo AK i col., 2003). Tot i així, hi ha dades recents que impliquen l'IFN- γ en la fallida inicial de l'empelt en illots singènics trasplantats al fetge (Yasunami Y i col., 2005), demostrant que l'expressió d'IFN- γ podria ser depenent de la zona on s'implanten els illots.

Les citocines inflamàtores de tipus 2, la IL-4 i la IL-10, tenen un efecte protector en els illots exposats a les citocines proinflamàtores (Rabinovitch A, 1998; Marselli L i col., 2001). De fet, la sobreexpressió d'aquests gens mitjançant adenovirus havia donat lloc a un millor pronòstic del trasplantament d'illots singènics (Zhang YC i col., 2002; Zhang YC i col., 2003). A més a més, en el trasplantament d'òrgans s'ha correlacionat la producció predominant de citocines de tipus 2, sobre les de tipus 1, amb la tolerància (Baan CC i Weimar W, 1998). En el nostre estudi no vam detectar la presència de IL-4 en cap de les mostres estudiades. Aquest resultat concordava amb les dades de trasplantament d'òrgans, on només es troba IL-4 en el trasplantament al·logènic (Dallman MJ i

col., 1991). Per contra, es va detectar un augment d'expressió significatiu d'IL-10 en els empelts normoglicèmics i hiperglicèmics de dia 1. Tot i que després aquests nivells disminuïen, es van mantenir elevats en els empelts exposats a hiperglicèmia en els dies 3 i 7, suggerint la presència d'una resposta protectora com a conseqüència de la major inflamació que es produeix en els animals hiperglicèmics.

Aquest estudi té algunes limitacions. En primer lloc, tot i que l'anàlisi de l'expressió gènica ens proporciona molta informació sobre els fenòmens que tenen lloc en els empelts d'illots, cal tenir en compte que les modificacions posteriors a la traducció i transcripció dels gens poden donar lloc a discrepàncies entre les dades obtingudes mesurant l'mRNA o la proteïna. En segon lloc, tot i el bon control i l'ús de condicions molt similars tant en l'aïllament com en el trasplantament dels illots, dins d'un mateix grup es trobà una gran variabilitat que pot dificultar la identificació d'algunes diferències entre grups. Aquesta variabilitat en l'expressió gènica no és deguda a que es carregui una quantitat diferent de RNA. La quantitat d'RNA total obtinguda dels empelts va ser molt similar per als diferents grups, amb independència de l'estat metabòlic del receptor. Tant en els grups hiperglicèmics com normoglicèmics es produïa una reducció de la quantitat d'RNA total respecte a la obtinguda amb el mateix nombre d'illots prèviament al trasplantament. Aquesta caiguda de l'RNA era d'un 60%, valor que es corresponia amb les dades de caiguda de la massa beta trasplantada que s'havien obtingut prèviament en el nostre grup (Biarnés M i col., 2002). Per a evitar errors en la interpretació dels resultats de l'expressió de les citocines deguts a la quantitat de RNA, vam usar el gen 18S com a control de càrrega (o *housekeeping gene*). L'ús del 18S en aquest model ha estat validat per el nostre grup usant la mateixa tècnica i les mateixes condicions (Rodríguez-Mulero S i Montanya E, 2005). En tercer lloc, la intensitat i les característiques de la inflamació que es produeix després del trasplantament poden ser diferents depenent del lloc d'implantació dels illots. De fet, la resposta inflamatòria sembla ser més important en els illots trasplantats al fetge on es detecta una gran producció de IFN- γ per part de les cèl·lules V α 14 NKT, una població cel·lular molt abundant a fetge (Yasunami Y i col., 2005). Així i tot, cal remarcar que s'ha trobat un augment força important de l'expressió de citocines en l'empelt tot i usar un lloc privilegiat per al trasplantament, com és sota la càpsula renal (Mellgren A i col., 1986), i també que sigui un model singènic. Aquests resultats recolzen la importància que té la inflamació en el trasplantament d'illots. I, finalment, els resultats trobats en models murins no són directament aplicables als illots humans. Les diferències entre espècies en quant a la sensibilitat dels illots a les citocines inflamatòries són ben conegudes i, per exemple, se sap que mentre que en illots de rata la IL-1 β pot tenir un efecte tòxic per si mateixa, en els illots humans cal que estigui amb combinació amb una o més citocines proinflamatòries per a tenir aquest mateix efecte (Eizirik DL i Darville MI, 2001).

Com ja s'ha comentat anteriorment els resultats obtinguts amb l'estudi del RNA cal comprovar-los amb l'estudi de la proteïna. Hem demostrat de manera directa per immunohistoquímica la presència tant d'IL-1 β com d'iNOS (òxid nítric sintasa induïble) en els empelt d'illots. La citotoxicitat induïda per IL-1 β en els illots de rosegadors està relacionada amb la inducció d'iNOS i la formació d'òxid nítric (NO) (Eizirik DL i col., 1992; Karlsen AE i col., 1995). El paper de l'NO en la mort de les cèl·lules beta induïda per les citocines està ben establert *in vitro*, i probablement és encara més important quan es tracta de l'illot sencer que en les cèl·lules beta purificades, que són les que s'usen normalment en aquests estudis (Hoorens A i col., 2001; Eizirik DL i Darville MI, 2001). El nostre grup ja havia descrit que en l'empelt hi havia expressió d'iNOS (Biarnés M, 2003), però és en aquest treball on es mostra la presència de la proteïna. En els illots de rosegadors l'NO és força important induint la mort de les cèl·lules beta i, especialment, la necrosi (Eizirik DL i Darville MI, 2001), tot i que en els illots humans l'NO no tingui un paper molt important en la mort de les cèl·lules beta (Delaney CA i col., 1997). En un estudi realitzat amb illots humans i de rata exposats a peroxinitrit (és el resultat de la reacció de l'NO amb el superòxid que es produeix *in vivo*, i és un oxidant molt potent) *in vitro*, es descriu com aquest anió indueix principalment necrosi en els illots de les dues espècies (Delaney CA i col., 1996). L'NO, però, també indueix apoptosi. En una línia de cèl·lules beta de hàmsster, les HIT, es va demostrar que l'NO induïa els tall internucleosomals del DNA i la formació de cossos apoptòtics, efectes típics de l'apoptosi, en aquestes cèl·lules, i que aquests efectes eren anul·lats si les cèl·lules es tractaven amb inhibidors de la NOS (Kaneto H i col., 1995). En illots humans també s'havia descrit com l'NO induïa l'expressió de Fas en les cèl·lules beta i les condueix a la mort per apoptosi (Stassi G i col., 1997). La presència d'iNOS en els empelts dels primers dies indica que s'està produint NO en l'empelt, que podria estar contribuint a la mort de les cèl·lules beta i la pèrdua de massa de l'empelt. La presència d'iNOS també ens indica la IL-1 β trobada en els empelts té un efecte tòxic sobre l'empelt contribuint a la inducció de l'expressió d'iNOS.

El tipus cel·lular productor de les citocines en l'empelt d'illots no ha estat ben descrit. Les preparacions d'illots trasplantades contenen diferents tipus cel·lulars. A més a més de les cèl·lules endocrines en l'empelt també es troba teixit exocrí, cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis, macròfags, cèl·lules dendrítiques, fibroblasts i d'altres, i algunes d'aquestes poden contribuir a la producció de les citocines. En aquest treball hem identificat els macròfags com els principals productors d'IL-1 β i d'iNOS en els primers dies després del trasplantament. També hem detectat la presència d'IL-1 β i d'iNOS de manera minoritària en d'altres tipus cel·lulars que no es corresponen a macròfags.

Ha estat descrit que tant les cèl·lules ductals com les endotelials poden produir IL-1 β en els illots humans aïllats i exposats a LPS + TNF- α + IFN- γ , tot i que siguin un petit nombre en comparació

amb els macròfags (Matsuda T i col., 2005). Hi ha estudis on cèl·lules beta purificades expressen IL-1 β en resposta a dsRNA i IFN- γ , mentre que les cèl·lules alfa purificades no l'expressen (Heitmeier MR i col., 2001). En aquest mateix treball de Heitmeier i col·laboradors es mostra com la IL-1 β colocalitza tant amb la insulina com amb macròfags. Com ja hem comentat, tots aquests tipus cel·lulars es troben en l'empelt i podrien ser els responsables del 5% de l'expressió de IL-1 β que no es correspon amb macròfags. De tota manera, els màxims responsables de l'expressió de IL-1 β en l'empelt serien els macròfags. El paper dels macròfags en la fallida de l'empelt ha estat demostrat en estudis en els quals s'observa una millora de la supervivència de les cèl·lules de l'empelt quan s'han eliminat o inactivat els macròfags que es troben en els illots tot just abans de trasplantar-los (Kaufman DB i col., 1990(b); Kaufman DB i col., 1994; Kenmochi T i col., 1996; Bottino R i col., 1998).

Hem mostrat com també són els macròfags qui principalment produeixen l'iNOS, la qual cosa estaria d'acord amb el proposat per Wiegand F i col. (1993). Aquest grup demostra com els macròfags poden matar les cèl·lules beta de manera NO-dependent quan els illots de rata es cocultiven amb macròfags en una relació de 1:1 (macròfag:cèl·lula beta). Els illots aïllats contenen un petit nombre de macròfags i és difícil aconseguir aquesta relació d'1 a 1, però en el trasplantament d'illots hi ha una gran quantitat de macròfags activats que infiltren l'empelt (Figura 26) i que podrien induir la mort de les cèl·lules beta, de manera similar al que passa en un teixit infectat o en tumors, on els macròfags que l'infiltren poden matar les cèl·lules per una via dependent de NO (Bruns CJ i col., 2000). A més d'estudis que mostren que els macròfags són productors de l'iNOS en els illots, hi ha d'altres fets en illots de rata i en humans on es demostra que les cèl·lules beta són les principals productores de NO en resposta a IL-1 β en el cas dels illots de rata, o en resposta a IL-1 β + IFN- γ en el cas dels humans (Corbett JA i McDaniel ML, 1995; Arnush M i col., 1998). En aquest treball també mostrem la presència de iNOS en els empelts dels primers dies després del trasplantament i com els macròfags en són els principals productors, tot i que també hi ha d'altres tipus cel·lulars responsables de la producció del NO en l'empelt.

De tots aquests resultats es pot concloure que durant els primers dies després del trasplantament es produeix una inflamació en la zona de la implantació dels illots (com demostra l'expressió de citocines i la presència de IL-1 β i iNOS en els empelts singènics) que podria ser força determinant en la pèrdua de funció primària que es dona en l'empelt com descriu l'estudi de Nagata M i col., 1990.

La pèrdua de funció primària deguda a la mort de les cèl·lules beta ja havia estat descrita (Davalli AM i col., 1996; Biarnés M i col., 2002). En l'estudi realitzat per el nostre grup es va determinar que es produïa una pèrdua de la massa inicialment trasplantada d'un 60% tant en empelts d'animals

normoglicèmics com d'hiperglicèmics. En aquesta pèrdua de la massa trasplantada hi contribuïen fenòmens de necrosi i d'apoptosi. El dia 3 després del trasplantament, s'observaven grans àrees de necrosi en l'empelt que corresponien al voltant d'un 30% de la massa insular trasplantada, i l'apoptosi de les cèl·lules beta era 10 vegades superior a la que es produïa en les cèl·lules beta en el pàncrees control. Tot i així, els valors d'apoptosi de les cèl·lules beta eren baixos, un 0.3-0.4% de totes les cèl·lules beta de l'empelt, i la importància d'aquest augment de l'apoptosi podria semblar menor. Tanmateix si tenim en compte que el procés d'apoptosi és un procés molt ràpid (inferior a 3 h, Majno G i Joris I, 1995), la detecció d'uns valors, fins i tot, baixos d'apoptosi pot representar un augment molt important en el total de cèl·lules beta de l'empelt que estan patint apoptosi i ser suficient per a reduir la massa beta trasplantada (Biarnés M i col., 2002) i col·laborar en la pèrdua de funció primària de l'empelt. En alguns models de malalties on està implicada l'apoptosi d'algun tipus cel·lular s'han emprat alguns inhibidors de les caspases (Cursio R i col., 2000; Mocanu MM i col., 2000; Daemen MA i col., 1999; Farber A i col., 1999; Cheng Y i col., 1998; Hara H i col., 1997; Cutillas B i col., 1999; Braun JS i col., 1999) incloent-hi en el trasplantament de neurones dopaminèrgiques (Schierle GS i col., 1999) que ens van fer pensar que aquests inhibidors podrien ser útils per a reduir l'apoptosi i millorar el nostre model de trasplantament d'illots a receptors diabètics, demostrant també que l'augment d'apoptosi era biològicament significatiu.

Amb els resultats obtinguts, sabíem de la presència de citocines en l'empelt i la seva possible contribució a la disfunció de les cèl·lules beta trasplantades. Coneixent que les citocines proinflamatòries i, en particular, la combinació de IL-1 β , TNF- α i IFN- γ indueixen la mort per necrosi i per apoptosi en les cèl·lules dels illots (Ozasa i col., 1997; Ling Z i col., 2000; Hoorens A i col., 2001), vam voler analitzar si un inhibidor d'ampli espectre de les caspases (z-VAD.fmk) podria reduir aquesta apoptosi. Es van fer uns experiments *in vitro* on l'addició de la barreja de citocines al medi de cultiu produïa un gran augment de l'apoptosi en les cèl·lules dels illots, que disminuïa quan s'usava el z-VAD.fmk. Només eren necessàries 2 h d'incubació abans a afegir l'estímul apoptòtic per aconseguir una reducció parcial (un 60%) de l'apoptosi induïda per les citocines i aquesta protecció s'exten, com a mínim, fins a les 72 h (un 35% de reducció).

En traslladar aquest estudi al model de trasplantament d'illots es va poder observar que els efectes del z-VAD.fmk sobre l'apoptosi dels illots trasplantats eren dependents de dosi. La concentració de 100 μ M, que reduïa a més de la meitat l'apoptosi induïda per les citocines *in vitro* no va modificar l'apoptosi en els illots quan es van trasplantar. Una major concentració (200 μ M) de l'inhibidor va aconseguir reduir l'apoptosi en els empelts tres dies després del trasplantament en un 50%. Tot i aquesta reducció de l'apoptosi, amb aquesta concentració de z-VAD.fmk no es va obtenir una millor evolució metabòlica del receptor i es van curar el mateix percentatge d'animals que en el grup d'animals trasplantats amb els illots control (30%). En canvi, quan es va usar una

concentració encara superior de z-VAD.fmk (500 μ M) es va obtenir un major percentatge de curació dels animals trasplantats, a més a més de la reducció de l'apoptosi en els empelts de tres dies després del trasplantament. Aquest mateix tipus de comportament dosi-dependent amb l'inhibidor de les caspases s'havia observat en estudiar l'efecte de la inhibició de les caspases sobre la mort de neurones dopaminèrgiques induïda per la falta de sèrum en el medi de cultiu (Schierle GS i col., 1999). De la mateixa manera, en aquest mateix estudi també es va necessitar una dosi alta (500 μ M) de l'inhibidor Ac-YVAD.cmk per a millorar la supervivència de les neurones trasplantades (Schierle GS i col., 1999). La necessitat d'usar altes dosis de l'inhibidor de les caspases per a reduir l'apoptosi dels illots trasplantats, sobretot si es comparen amb la més baixa concentració que va ser efectiva en l'estudi *in vitro*, pot reflexar la major quantitat i les diferents intensitats dels estímuls que contribueixen a la mort de les cèl·lules beta durant els primers dies després del trasplantament.

Tot i la reducció de l'apoptosi de les cèl·lules beta trasplantades i la millora de l'evolució metabòlica, la massa beta trasplantada es trobava igualment reduïda el dia 3 després del trasplantament i un 57% dels receptors trasplantats amb els illots preincubats amb una dosi de 500 μ M de z-VAD.fmk es van mantenir hiperglucèmics. A més, encara que l'apoptosi es va reduir en un 50% en els illots preincubats amb el z-VAD.fmk abans del trasplantament, la mort per apoptosi de les cèl·lules beta trasplantades seguia sent superior a la que es produeix en el pàncrees.

En el cas dels limfòcits B s'havia descrit que la inhibició de l'apoptosi amb inhibidors de les caspases el que produïa no era un rescat de les cèl·lules, sinó que aquestes cèl·lules morien per necrosi (Lemaire C i col., 1998). Així doncs, podia ser que en el nostre cas, les cèl·lules beta que es recuperaven estiguessin morint de totes maneres per necrosi. Però en mesurar-la, vam poder comprovar que no hi havia diferències en el percentatge de necrosi entre els diferents grups, control i tractament amb les dues concentracions diferents de l'inhibidor. Tot i això, apoptosi i necrosi no són més que els extrems de tot un ampli ventall de diferents tipus de mort que es poden produir en les cèl·lules, i hi ha d'altres estudis on s'ha demostrat que la inhibició de les caspases no pot rescatar a aquelles cèl·lules que han estat danyades de manera irreparable i acaben morint de totes maneres, encara que més lentament i sense mostrar les característiques morfològiques i bioquímiques típiques de l'apoptosi (Green D i Kroemer G, 1998). Aquesta mort programada no apoptòtica s'ha descrit, per exemple, quan s'han usat diferents moduladors farmacològics (com els inhibidors de les caspases) de la via apoptòtica en els processos neurodegeneratius (Sperandio S i col., 2000). D'altres exemples en els quals es produeix mort programada no apoptòtica són en les cèl·lules Jurkat quan s'inhibeix la via de les caspases amb el z-VAD.fmk, en el que es produeix és una alteració de la membrana mitocondrial que condueix a la mort de la cèl·lula (Xiang J i col., 1996) o en el cas de macròfags (J774A.1 i RAW264.7) quan també s'usa el z-VAD.fmk i aquest

indueix la mort no-apoptòtica d'aquestes cèl·lules (Martinet W i col., 2006). Aquest tipus de mort programada podria estar contribuint a que de totes maneres es produís una important reducció de la massa beta en els primers dies després del trasplantament dels illots tractats amb el z-VAD.fmk i limitar els efectes beneficiosos que tindria la inhibició de les caspases. Cal, però, tenir en compte que, tot i considerar aquestes limitacions, la reducció de l'apoptosi inicial en els illots tractats amb el z-VAD.fmk va permetre augmentar la massa beta de l'empelt i millorar el pronòstic del trasplantament a llarg termini.

De manera experimental s'han usat diferents estratègies per tractar de millorar l'evolució dels illots trasplantats. Normalment els resultats d'aquestes intervencions s'han determinat basant-se només en canvis en la condició metabòlica del receptor. L'ús d'aquesta valoració únicament metabòlica pot fer que es perdi informació fonamental de l'eficàcia de la intervenció que sí es pot obtenir quan es mesuren d'altres paràmetres com la massa, la replicació o la mort de les cèl·lules beta trasplantades. Per exemple, el nostre grup va demostrar que es podia millorar l'evolució metabòlica del receptor i disminuir la massa de cèl·lules beta necessàries per a aconseguir la normogluccèmia si el receptor es mantenia normogluccèmic durant els primers dies després del trasplantament (Merino JF i col., 1997). Però quan vàrem mesurar la massa beta dels empelts observàrem que la normogluccèmia no permetia conservar la massa beta trasplantada, que estava disminuïda per igual en els receptors hipergluccèmics i normogluccèmics. Així doncs, l'efecte beneficiós no era degut al manteniment de la massa beta trasplantada sino que, probablement, era degut a la preservació de la funció en les cèl·lules beta trasplantades en condicions de normogluccèmia inicialment després del trasplantament (Merino JF i col., 1997; Raurell M i col., 1999). En els experiments que es mostren en aquest treball s'ha pogut comprovar, en mesurar l'apoptosi dels empelts, que la concentració de 200 μ M de z-VAD.fmk era eficaç reduint la mort per apoptosi dels illots trasplantats, i aquest efecte beneficiós no s'hauria detectat si només s'hagués mesurat l'evolució metabòlica dels receptors. Aquest efecte beneficiós es va confirmar en trasplantar illots preincubats amb una major dosi de l'inhibidor de les caspases i comprovar que una major proporció de receptors hipergluccèmics es curaven, però també —i és una dada molt important— perquè aquests receptors presentaven una major massa beta trasplantada a llarg termini que els empelts d'illots control.

La limitada disponibilitat d'òrgans per el trasplantament així com la pèrdua de teixit que es produeix després del trasplantament dels illots pancreàtics són dues limitacions amb les quals es troba el trasplantament d'illots pancreàtics. El millor coneixement dels processos que es produeixen durant els primers moments després del trasplantament d'illots obre tot un ventall de possibilitats per desenvolupar estratègies que permetin augmentar la supervivència dels illots trasplantats i reduir les limitacions amb que es troba el trasplantament d'illots pancreàtics.