

**UNIVERSITAT DE BARCELONA**  
**Facultat de Medicina**  
**Departament de Ciències Clíiques**

**Sobreexpressió de l'Antagonista del Receptor  
d'Interleucina 1 (IL-1Ra) en els illots pancreàtics.  
Efectes sobre viabilitat, funció i regeneració de les  
cèl·lules beta.**

Noèlia Téllez i Besolí  
2006



# UNIVERSITAT DE BARCELONA

Programa de Biomedicina

Bienni 2000-2002

Memòria presentada per la llicenciada NOÈLIA TÉLLEZ i BESOLÍ per optar al grau de Doctora en Biologia.

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Eduard Montanya i Mias en el laboratori de Diabetis i Endocrinologia Experimental del departament de Ciències Clíniques a l'Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), Universitat de Barcelona.

Noèlia Téllez i Besolí

Dr. Eduard Montanya i Mias



**Gràcies** a tots i totes els qui m'heu ajudat i heu fet possible que això que teniu entre les mans sigui una realitat. Gràcies per haver estat pacients, disposats, i en definitiva aquí, quan us he necessitat. **MERCI a tothom.**

Hi ha alguns de vosaltres que mereixeu una atenció especial, i que sense el vostre recolzament tot hagués sigut una mica més dur...

Bé, en primer lloc t'he d'agrair a tu, Eduard, la confiança que vas dipositar en mi per a que formés part del teu grup de recerca, pels teus consells i en definitiva per tot el que m'has ensenyat.

Ara venen les meves nenes!!!!!! les millors i incomparables, les més fantàstiques “del món mundial” les.... no hi ha paraules!!! ja ho sabeu... però no està de més que de tant en tant us ho digui... que sou “de lo milloret que corre o ha corregut per Bellvitge”!!!

Una per una... Montse, tu em vas introduir en el “món de les ratetes”, de l'aïllament d'illots, del trasplantament i de la IL-1... bàsic pel que ha estat aquesta tesi. El teu bon humor i la teva predisposició a ajudar-me va fer molt fàcil l'inici d'aquesta aventura. Gràcies Montserratinall

Olga, contigo quedé impresionada con la inclusió de esos pellets de islotes, **INCREÍBLE!** Merci por todo!

Martona, ai “coraçón”...!!!! hem compartit tantes coses que no sé ni per on començar! Què t'he de dir... que ets la reina de cultius, de les CKs, del TaqMan, de “los malditos roedores”, de la revisió d'escrits... i milions de coses més... i que sobretot ets una gran amiga! Merci per TOT!!

Jessi, cuantas emociones fuertes, eh?!! Quién nos iba a decir que la BrdU sería tan... diremos “agitada”...por no hablar de los trasplantes de 1200 o de las baterías de “chorrocientos” pellets! Guapa! Sin tu ayuda... no me lo puedo imaginar! Gracias Jessil

Eli, companya d'adenovirus, de citòmetre, d'IL-1, d'EASD... de shopping, de margaritas... no acabaríem mai!! Merci per tota l'ajuda prestada durant tots aquests anys i com no...per fer de reportera gràfica del trasplantament! Merci per tenir tantes “neurones mirall”! Un petó!!

Sílvia, crack del reference manager, sense aquest programet l'escriptura de la tesi hagués estat un verdader calvaril. Merci per les teves suggerències i aportacions.

A les UTIPs, a “les reines de la nit del Duran” una abraçada!, també us he d'agrair la vostra col·laboració i consells. Gràcies.

No creguis que m'oblido de tu, Géraldinel, la nova (o ja no tan nova) adquisició... companya de regeneració. Merci per la teva ajuda, sobretot

amb els ordinadors! Ha estat imprescindible per no caure en la desesperació en moments crítics de la generació d'aquest "llibre". Un bisou!!

A totes vosaltres, gràcies un altre cop!

També recordo amb especial carinyo l'ajuda de l'Ester i el Benja dels SCT, fins i tot abans de formar part dels serveis. Merci Ester per l'ajut amb el citòmetre i l'anexina, vaig aprendre moltíssim! i a tu, Benja, merci per estar sempre disposat a escoltar i solucionar els nostres "problemilles" amb les immunos, western, etc. Merci a tots dos!

A les "nefro", merci a totes per estar disposades a ajudar i col·laborar. I al sector "loco" dir-vos que és un plaer treballar a prop vostre! Un petó.

Als veïns d'infeccioses, merci per tot, per les converses amb la Sandra i també amb el Ferran!, per l'ajuda i per ser tan macos!

En general gràcies a tots els que esteu o heu estat per la 4a planta durant aquest temps!

També vull donar les gràcies al personal de l'estabulari per cuidar les nostres ratetes i per facilitar-nos la feina.

Finalment i ja per a acabar, vull donar les gràcies a tots els qui no esteu relacionats amb Bellvitge ni amb la recerca, però que sou els que esteu més a prop meu, i que per tant heu patit amb els meus patiments i us heu alegrat amb les meves alegries. Gràcies a tots, als de Roquetes i als que vàreu emigrar cap a terres barcelonines i també als que sempre heu estat barcelonins. A tots un petó molt fort!

I a tu Ignasi, et dedico la tesi, crec que és just si tenim en compte que t'has convertit en un expert dels illots pancreàtics i de les cèl·lules beta, degut a les vegades que m'has hagut d'escoltar... per recolzar-me en tot i perquè no dir-ho! per haver-me ajudat amb algun experiment!! Un petó de pel·lícula!!

## ÍNDEX





<b>ABREVIATURES</b> .....	15
<b>RESUM</b> .....	21
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	27
<b>1.- L'illot pancreàtic i la cèl·lula beta</b> .....	29
<b>1.1.- Biosíntesi i secreció d'insulina</b> .....	30
1.1.1.- <i>El gen</i> .....	30
1.1.2.- <i>La proteïna</i> .....	31
1.1.3.- <i>Regulació de la síntesi i secreció d'insulina</i> .....	32
<b>2.- Massa cel·lular beta</b> .....	33
<b>2.1.- Canvis en la mida de les cèl·lules beta</b> .....	33
<b>2.2.- Canvis en el nombre de cèl·lules beta</b> .....	34
2.2.1.- <i>Neogènesi</i> .....	34
2.2.2.- <i>Replicació</i> .....	36
2.2.2.1.- <i>Progressió del cicle cel·lular de les cèl·lules beta</i> .....	36
2.2.3.- <i>Mort</i> .....	39
2.2.3.1.- <i>Apoptosi</i> .....	40
2.2.3.2.- <i>Necrosi</i> .....	41
<b>3.- Diabetis Mellitus</b> .....	44
<b>3.1.- Diabetis Mellitus tipus 1</b> .....	44
3.1.1.- <i>Etiopatogènia de la malaltia</i> .....	44
3.1.2.- <i>Destrucció de les cèl·lules beta en la DM-1</i> .....	45
<b>3.2.- Diabetis Mellitus tipus 2</b> .....	49
3.2.1.- <i>Etiopatogènia de la malaltia</i> .....	49
<b>4.- Citocines proinflamatòries i la cèl·lula beta</b> .....	51
<b>4.1.- Família de la Interleucina 1 (IL-1)</b> .....	52
<b>4.2.- Senyalització intracel·lular d'IL-1</b> .....	57

<b>4.3.- IL-1<math>\beta</math> i la cèl·lula beta.....</b>	<b>59</b>
4.3.1.- <i>IL-1<math>\beta</math> i funció de les cèl·lules beta.....</i>	59
4.3.2.- <i>IL-1<math>\beta</math> i viabilitat de les cèl·lules beta.....</i>	61
4.3.3.- <i>IL-1<math>\beta</math> i proliferació de les cèl·lules beta.....</i>	62
<b>5.- Teràpies per la curació de la diabetis.....</b>	<b>63</b>
<b>5.1.- Trasplantament.....</b>	<b>63</b>
5.1.1.- <i>Trasplantament de pàncrees.....</i>	63
5.1.2.- <i>Trasplantament cel·lular.....</i>	64
5.1.2.1.- <i>Trasplantament d'illots pancreàtics.....</i>	64
5.1.2.2.- <i>Trasplantament de cèl·lules productores d'insulina..</i>	67
<b>5.2.- Teràpia gènica.....</b>	<b>73</b>
5.2.1.- <i>Adenovirus.....</i>	75
5.2.1.1.- <i>Característiques generals.....</i>	75
5.2.1.2.- <i>Infecció amb adenovirus.....</i>	76
5.2.1.3.- <i>Adenovirus com a vectors d'expressió.....</i>	77
5.2.1.4.- <i>Adenovirus i l'illot pancreàtic.....</i>	79
<b>BIBLIOGRAFIA CITADA A LA INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>81</b>
<b>HIPÒTESI I OBJECTIUS.....</b>	<b>105</b>
<b>MATERIAL I MÈTODES.....</b>	<b>109</b>
<b>1.- Disseny experimental.....</b>	<b>111</b>
<b>2.- Animals d'experimentació.....</b>	<b>112</b>
<b>3.- Aïllament d'illots pancreàtics.....</b>	<b>112</b>
<b>4.- Preparació dels adenovirus recombinants.....</b>	<b>113</b>
<b>5.- Infecció dels illots amb adenovirus.....</b>	<b>115</b>

<b>6.- Cultiu dels illots.....</b>	<b>115</b>
6.1.- Eficiència de la infecció i viabilitat cel·lular dels illots .....	115
6.2.- Efecte de la IL-1 $\beta$ i de la sobreexpressió d'IL-1Ra sobre els illots.....	116
<b>7.- Inducció de la diabetis.....</b>	<b>116</b>
<b>8.- Mesura de la glucèmia i del pes.....</b>	<b>116</b>
<b>9.- Trasplantament d'illots pancreàtics.....</b>	<b>117</b>
9.1.- Procediment del trasplantament .....	117
<b>10.- Recuperació dels empelts d'illots .....</b>	<b>118</b>
<b>11.- Citometria de flux .....</b>	<b>119</b>
11.1.- El citòmetre .....	119
11.2.- Preparació de la mostra .....	119
11.3.- Eficiència de la infecció.....	120
11.4.- Viabilitat cel·lular .....	120
11.5.- Apoptosi i necrosi.....	120
<b>12.- Western blot.....</b>	<b>122</b>
<b>13.- Immunohistoquímica.....</b>	<b>125</b>
13.1.- Determinació de l'eficiència de la infecció de les cèl·lules beta de l'illot.....	125
13.2.- Marcatge dels macròfags .....	126
13.3.- Expressió d'IL-1Ra en els illots abans i després del trasplantament .....	127
13.4.- Determinació de l'apoptosi de les cèl·lules beta .....	128
13.5.- Determinació de la proliferació de les cèl·lules beta .....	130
13.6.- Determinació de l'àrea individual de les cèl·lules beta .....	131
13.7.- Determinació de la massa beta .....	132
13.8.- Determinació de la necrosi insular .....	134
<b>14.- Viabilitat cel·lular per microscopia .....</b>	<b>134</b>
<b>15.- Secreció d'insulina en resposta a glucosa .....</b>	<b>135</b>

<b>16.- Determinació de DNA.....</b>	<b>136</b>
<b>17.- Expressió del gen d'IL-1<math>\beta</math>.....</b>	<b>136</b>
17.1.- Extracció d'RNA.....	136
17.2.- Síntesi de cDNA.....	137
17.3.- PCR a temps real.....	138
17.4.- Anàlisi dels resultats.....	140
<b>18.- Anàlisi estadística.....</b>	<b>140</b>
<b>BIBLIOGRAFIA CITADA AL MATERIAL I MÈTODES.....</b>	<b>141</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>143</b>
<b>Estudi de l'efecte d'IL-1<math>\beta</math> i de la sobreexpressió d'IL-1Ra en els illots en cultiu .....</b>	<b>145</b>
<b>1.- Infecció dels illots.....</b>	<b>145</b>
1.1.- <i>Eficiència de la infecció</i> .....	145
1.2.- <i>Viabilitat cel·lular dels illots</i> .....	147
1.3.- <i>Funció de les cèl·lules beta dels illots</i> .....	148
1.4.- <i>Expressió de l'antagonista del receptor d'IL-1 (IL-1Ra)</i> .....	148
<b>2.- La sobreexpressió d'IL-1Ra protegeix les cèl·lules beta de l'apoptosi induïda per IL-1<math>\beta</math>.....</b>	<b>149</b>
<b>3.- La sobreexpressió d'IL-1Ra en els illots augmenta la replicació de les cèl·lules beta i les protegeix dels efectes deleteris d'IL-1<math>\beta</math>..</b>	<b>154</b>
<b>4.- Expressió del gen d'IL-1<math>\beta</math> en els illots .....</b>	<b>156</b>
<b>Estudi del paper d'IL-1 i de la sobreexpressió d'IL-1Ra en el trasplantament d'illots pancreàtics .....</b>	<b>157</b>
<b>5.- Eficiència de la infecció .....</b>	<b>157</b>
<b>6.- Expressió d'IL-1Ra en els illots abans i després del trasplantament.....</b>	<b>159</b>

<b>7.- Morfologia dels empelts d'illots.....</b>	<b>160</b>
<b>8.- Distribució i abundància dels macròfags en els empelts d'illots .</b>	<b>161</b>
<b>9.- Evolució metabòlica dels animals trasplantats amb 500 illots ....</b>	<b>162</b>
<b>10.- Mort de les cèl·lules beta dels illots trasplantats .....</b>	<b>164</b>
<i>8.1.- Apoptosi de les cèl·lules beta dels illots trasplantats.....</i>	<i>164</i>
<i>8.2.- Necrosi insular dels empelts d'illots.....</i>	<i>165</i>
<b>11.- Proliferació de les cèl·lules beta dels illots trasplantats .....</b>	<b>167</b>
<b>12.- Àrea individual de les cèl·lules beta dels illots trasplantats .....</b>	<b>169</b>
<b>13.- Evolució de la massa beta trasplantada .....</b>	<b>170</b>
<b>14.- Evolució metabòlica dels animals trasplantats amb 800 illots...</b>	<b>171</b>
<b>DISCUSSIÓ.....</b>	<b>173</b>
<b>BIBLIOGRAFIA CITADA A LA DISCUSSIÓ.....</b>	<b>193</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>199</b>
<b>PRODUCCIÓ CIENTÍFICA DERIVADA D'AQUEST TREBALL.....</b>	<b>203</b>



## **ABREVIATURES**





Ad-GFP: adenovirus codificant per la proteïna verda fluorescent  
Ad-IL-1Ra: adenovirus codificant per l'Antagonista del Receptor d'IL-1  
Ad-Lac-Z: adenovirus codificant per la betagalactosidasa  
ADP: adenosina difosfat  
AG: aminoguanidina  
An: anexina V  
AO: taronja d'acridina  
APC: cèl·lula presentadora d'antigen  
ATP: adenosina trifosfat  
BrdU: bromo-deoxi-uridina  
BSA: albúmina sèrica bovina  
BTC: betacel·lulina  
cDNA: àcid DesoxiriboNucleic complementari  
DAB: diaminobenzidina  
DM: diabetis mellitus  
DNA: àcid desoxi-ribonucleic  
DTT: ditiotreitòl  
EDTA: etilendiaminotetreacètic  
EGF: factor de creixement epidèrmic  
EI: eficiència d'infecció  
ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*  
ERK: quinasa relacionada amb senyals extracel·lulars  
EtBr: bromur d'etidi  
GAD: àcid glutàmic descarboxilasa  
GH: hormona de creixement  
GLP-1: pèptid similar a glucagó-1  
GSK-3 $\beta$ : glucogen sintasa quinasa -3 $\beta$   
GTP: guanidinatrifosfat  
HGF: factor de creixement d'hepatòcits  
ICA : anticòs anti-illot

## Abreviatures

ICE: enzim convertidor d'IL-1

IFN- $\gamma$  : interferó  $\gamma$

IGF: factor de creixement similar a insulina

IL-1: interleucina-1

IL-10 : interleucina 10

IL-1R : receptor d'IL-1

IL-1Ra: antagonista del receptor d'IL-1

IL1RacP : proteïna accessòria acoplada al receptor d'IL-1

IL-2 : interleucina 2

IL-6: interleucina-6

iNOS : òxid nítric sintasa induïble

IP: iodur de propidi

IRAK : proteïna kinasa associada al receptor d'IL-1

IRS: substrat del receptor d'insulina

ITR : regió terminal invertida

JNK: quinasa c-jun n-terminal

Kd: constant de dissociació

Km: constant de Michaelis Menten

KRBH: krebbs ringer

MAPK: proteïnes quinasa activades per mitògens

MHC: complex major d'histocompatibilitat

MOI : multiplicitat d'infecció

NF $\kappa$ B: factor nuclear  $\kappa$ B

NIK: kinasa inductora de NF $\kappa$ B

NMMA: N-mono-metil-L-arginina

NO: òxid nítric

NOD: diabètic no obès

NSF: factor soluble sensible a *N*-ethylmaleimide

PBS: tampó fosfat salí

PDAR: reactius desenvolupats pels assajos TaqMan®  
PDX-1 : *pancreatic duodenal homeobox -1*  
PFA: paraformaldehid  
pfu : unitats formadores de calves  
PKB / AKT: proteïna kinasa Serina-Treonina  
PKC: proteïna kinasa C  
PL: lactogen placentari  
PRL: prolactina  
PNF : no funció primària  
PPS: proteïna pancreàtica *stone*  
PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>: fosfatidil inositol (4,5) difosfat  
RCA : adenovirus replicatius competents  
RNA: àcid ribonucleic  
RT-PCR: transcripció reversa-reacció en cadena de la polimerasa  
SAPK: proteïna kinasa activada per estrés  
Ser: serina  
SNARE: proteïnes d'adhesió a NSF soluble  
TBST: tampó Tris salí amb tritó  
TBSTA: tampó Tris salí amb tritó i albúmina  
TGF-β: factor transformant β  
Thr: treonina  
TNF: factor de necrosi tumoral  
TRAF: factor associat al receptor de TNF  
Tx: trasplantament  
Tyr: tirosina



**RESUM**



La massa de cèl·lules beta pancreàtiques és dinàmica i està regulada per mantenir la normoglicèmia de l'individu. La renovació de la població de les cèl·lules beta del pàncrees adult és lenta. La formació de noves cèl·lules és dóna a partir de la proliferació de cèl·lules beta preexistents i de la diferenciació de cèl·lules multipotencials que es troben en el pàncrees adult mentre que l'eliminació de les cèl·lules esdevé per apoptosi. Existeixen evidències experimentals que demostren la capacitat de la massa beta per adaptar-se a diverses situacions, com l'embaràs o pancreatectomia parcial, on es dóna un augment de la proliferació de les cèl·lules beta en resposta a la demanda d'insulina i així mantenir la normoglicèmia de l'individu.

La diabetis mellitus tipus 1 és una malaltia autoimmunitària caracteritzada per la destrucció selectiva de les cèl·lules beta pancreàtiques. S'hipotetitzava que aquesta destrucció està mediada per citocines proinflamatòries (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, etc) produïdes pels limfòcits T infiltrats en el teixit insular, i pels macròfags activats. Tot i que s'activen mecanismes de protecció en les cèl·lules beta, hi ha una destrucció substancial que juntament amb la incapacitat d'aquestes cèl·lules per compensar la massa beta perduda, resulta en diabetis.

El trasplantament d'illots pancreàtics és una teràpia emergent per la curació de la diabetis mellitus. Amb aquest tractament s'aconseguiria un control acurat de la glucèmia de l'individu evitant les complicacions que es deriven d'una mala regulació dels nivells de glucosa en sang.

Una de les limitacions del trasplantament d'illots radica en la baixa disponibilitat d'òrgans i l'elevada demanda existent, que queda agreujada amb l'elevat nombre d'illots que són necessaris per restablir la normoglicèmia del pacient. Una de les raons per les que és necessari un elevat nombre d'illots per cada trasplantament és la pèrdua important de massa beta (més del 50%) que té lloc durant els primers dies després del

## Resum

trasplantament. Aquesta pèrdua es correspon amb uns nivells elevats d'apoptosi i necrosi de les cèl·lules beta i amb una limitació en la proliferació d'aquestes cel·lules incapaç de compensar l'augment de mort.

Estudis recents del nostre grup, han mostrat que en els primers dies després del trasplantament hi ha un augment de l'expressió d'IL-1 $\beta$  en els empelts d'illots. Aquesta citocina proinflamatòria forma part de la família d'IL-1, que està formada per membres pro- i anti-inflamatoris. Entre els membres proinflamatoris es troben els lligands IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , i el complex del receptor tipus 1; i entre els anti-inflamatoris cal anomenar el receptor tipus 2 (scavenger) i l'Antagonista del Receptor tipus 1 (IL-1Ra), que s'uneix al receptor tipus 1 sense iniciar la senyalització intracel·lular. Les propietats antiinflamatòries d'IL-1Ra el fan particularment interessant en el disseny d'estratègies terapèutiques dirigides al bloqueig de l'acció d'IL-1.

La hipòtesi de treball és que la citocina proinflamatòria, IL-1, està implicada en la fallada del trasplantament. Designant la sobreexpressió d'IL-1Ra com l'estratègia a seguir per millorar el pronòstic del trasplantament singènic d'illots pancreàtics.

Per tant, l'objectiu general de l'estudi va ser determinar si la sobreexpressió d'IL-1Ra en els illots pancreàtics protegeix les cèl·lules beta pancreàtiques dels efectes deleteris d'IL-1 en els illots i millora el pronòstic del trasplantament.

L'estudi dels efectes d'IL-1 $\beta$  i de la sobreexpressió d'IL-1Ra in vitro es va realitzar amb un cultiu primari d'illots de rata que van ser exposats durant 48h a 5.5 o 22.2 mM de glucosa en presència o absència de 50U/ml d'IL-1 $\beta$ . I la inserció del gen exogen a les cèl·lules dels illots es va fer utilitzant un adenovirus V recombinant.



Després de 48h de la infecció el 100% dels illots i un 26% de les cèl·lules beta d'aquests expressaven el transgèn. El procés d'infecció no va alterar la proliferació, ni la viabilitat, ni la funció de les cèl·lules beta.

La proliferació de les cèl·lules beta (determinada per incorporació de BrdU) va disminuir dràsticament quan es van exposar els illots a 50 U/ml d'IL-1 $\beta$ , tant a 5.5 mM com a 22.2 mM de glucosa. Aquest efecte d'IL-1 $\beta$  va quedar completament abolit per la sobreexpressió d'IL-1Ra en els illots que havien estat infectats amb l'adenovirus que codificava per l'antagonista, a les dues concentracions de glucosa utilitzades.

L'apoptosi de les cèl·lules beta (determinada per immunohistoquímica mitjançant la tècnica del TUNEL i per citometria de flux, marcant les cèl·lules amb annexina V i iodur de propidi) estava significativament augmentada en els illots exposats a IL-1 $\beta$ , però no en els illots que sobreexpressaven IL-1Ra.

L'estudi dels efectes de la sobreexpressió d'IL-1Ra en els illots trasplantats es va realitzar utilitzant un model de trasplantament singènic. Grups de 500 illots control (no infectats) o que sobreexpressaven IL-1Ra van ser trasplantats sota la càpsula renal de rates Lewis diabètiques. 500 illots són una massa beta clarament insuficient per restablir la normoglicèmia, així doncs els animals d'ambdós grups es van mantenir hiperglicèmics durant tot l'estudi. Els empelts es van recuperar després de 3, 10 i 28 dies del trasplantament i es van processar per fer estudis histològics.

La sobreexpressió d'IL-1Ra en els illots trasplantats va fer augmentar significativament la proliferació de les cèl·lules beta dels empelts de 3, 10 i 28 dies i va protegir parcialment les cèl·lules beta de l'increment d'apoptosi detectat després del trasplantament, tant a curt com a llarg termini. L'àrea individual de les cèl·lules beta estava augmentada de manera similar tant en els empelts d'illots control com en els illots que

## Resum

sobreexpressaven IL-1Ra als 10 i 28 dies d'evolució. Finalment, la sobreexpressió d'IL-1Ra resultà en una recuperació de la massa beta inicialment trasplantada.

Per tal d'estudiar si els efectes beneficiosos de la sobreexpressió d'IL-1Ra aconseguien reduir el nombre d'illots necessaris per restablir la normoglicèmia, es va trasplantar una massa beta marginal (800 illots) d'illots control i Ad-IL-1Ra a animals diabètics. El 100% dels animals trasplantats amb illots Ad-IL-1Ra eren normoglicèmics després de 14 dies del trasplantament i només un 40% dels animals trasplantats amb illots control assoliren l'euglicèmia en aquest dia.

En aquest treball es mostra que la citocina proinflamatòria IL-1 $\beta$  indueix clarament apoptosi a les cèl·lules beta dels illots de rata en cultiu i inhibeix dràsticament la replicació d'aquestes cèl·lules. La sobreexpressió d'IL-1Ra protegeix les cèl·lules beta dels efectes deleteris d'aquesta citocina i amplifica la resposta replicativa de les cèl·lules beta exposades a concentracions altes de glucosa. La sobreexpressió d'IL-1Ra en els illots augmenta la replicació de les cèl·lules beta trasplantades, les protegeix de l'apoptosi induïda després del trasplantament, i preserva la massa beta inicialment trasplantada. Els efectes beneficiosos de la sobreexpressió d'IL-1Ra observats en els illots trasplantats permeten reduir el nombre d'illots necessaris per restablir la normoglicèmia dels animals diabètics.

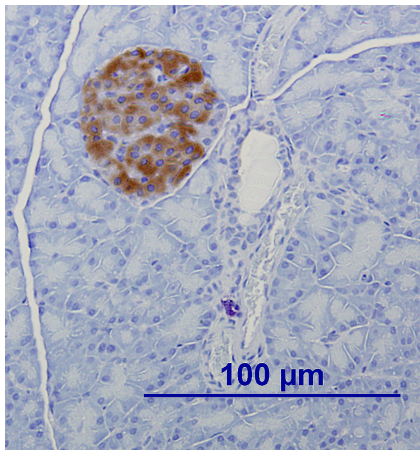
Aquests resultats suggereixen que la IL-1 juga un paper important en l'evolució dels empelts d'illots, ja que el seu bloqueig implica una millora dels illots trasplantats.

## **Introducció**



## 1.- L'illot pancreàtic i la cèl·lula beta.

El pàncrees està format per cèl·lules acinars (pàncrees exocrí) que envolten illots de cèl·lules productores d'hormones (pàncrees endocrí) altament vascularitzats i innervats. Aquestes agrupacions de cèl·lules endocrines reben el nom d'illots pancreàtics o illots de Langerhans en honor a Paul Langerhans qui els va descriure l'any 1869. Estan distribuïts per tota la porció exocrina del pàncrees i tot i que n'hi ha aproximadament 1 milió en un pàncrees humà, representen menys d'un 2% del conjunt cel·lular.



**Fig.1 Micrografia d'una porció de pàncrees de rata que inclou un illot de Langerhans.** En marró estan marcades les cèl·lules beta, secretores d'insulina.

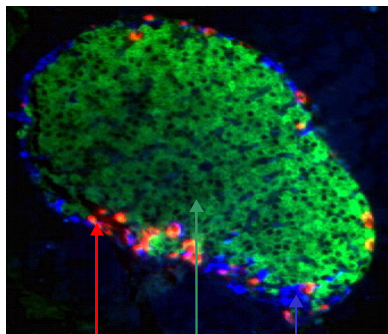
Els illots pancreàtics són els responsables del control glucèmic de l'individu, estimulant la captació de glucosa per part dels teixits perifèrics mitjançant la secreció d'insulina en resposta als nivells de glucosa en sang. En aquest control glucèmic hi participen les tres hormones principals secretades en els illots, la insulina, el glucagó (que inhibeix la secreció d'insulina) i la somatostatina (que inhibeix la secreció de les dues anteriors).

Els illots pancreàtics estan formats, en la seva major part, per cèl·lules beta ( $\beta$ ) que sintetitzen i secreten insulina, cèl·lules alfa ( $\alpha$ ),

## Introducció

productores de glucagó; delta ( $\delta$ ) productores de somatostatina i PP, de polipèptid pancreàtic.

Aquests tipus cel·lulars es troben en diferents proporcions formant part dels illots<sup>63</sup>. Les cèl·lules  $\beta$  representen, en el cas dels rosegadors, entre un 70-80% de l'illot, aquestes es troben majoritàriament en el centre de l'illot envoltades per les cèl·lules  $\alpha$  que representen un 8-12%, per les  $\delta$  (4-8%) i per les PP que es troben en menor proporció (3-4%).



**Fig. 2. Micrografia d'un illot pancreàtic de rosegador tenint per les diferents hormones que produeixen les cèl·lules que el componen.** Les cèl·lules  $\alpha$ , secretores de glucagó (vermell), les cèl·lules  $\delta$ , secretores de somatostatina (blau), les cèl·lules PP, secretores de polipèptid pancreàtic (blau), i finalment les més abundants, les cèl·lules  $\beta$  que secreten insulina.

Les cèl·lules beta són un tipus cel·lular altament diferenciat i especialitzat, i les úniques de l'organisme adult que produeixen i secreten insulina. Aquesta característica les fa imprescindibles pel correcte manteniment de la glucèmia de l'individu.

### 1.1.- Biosíntesi i secreció d'insulina

#### 1.1.1.- *El gen*

El gen de la insulina humana es troba en la regió p15.5 del cromosoma 11<sup>157</sup> i consta de 3 exons i 2 introns<sup>206</sup>. Els rosegadors tenen 2 gens que codifiquen per les insulines 1 i 2. En el cas de les rates aquests dos gens es troben en el mateix cromosoma, l'1<sup>199</sup>; en canvi en els ratolins es

troben en dos cromosomes diferents, el cromosoma 7 i el 9<sup>40</sup>. La insulina 2 és específica de cèl·lula beta, en canvi la 1 no ho és.

El promotor del gen de la insulina conté llocs d'unió per diversos factors de transcripció (com el PDX-1), que són imprescindibles per l'expressió del gen, i que condicionaran el grau de diferenciació de la cèl·lula beta<sup>139</sup>. El transcrit d'RNA té uns 1500 nucleòtids, i els seus nivells estan modulats per glucosa, AMPc i dexametasona, a més d'altres sucres, aminoàcids, citocines i ions.

### *1.1.2.- La proteïna*

La insulina és una proteïna de 6 KDa que se sintetitza com a precursor (pre-proinsulina) en el reticle endoplasmàtic rugós. En el pol cis de l'aparell de Golgi pateix la primera modificació per tall del pèptid senyal i es converteix en proinsulina. Aquesta molècula més estable de 9 KDa passa cap al pol trans de l'aparell de Golgi on es formen els grànuls de secreció. Ja en els grànuls es dona la maduració de la proinsulina<sup>177</sup>.

En primer lloc, després de la formació dels grànuls de secreció, la proinsulina és tallada per dues convertases (Endopeptidasa 1 i 2) donant lloc al pèptid C (3 KDa) i a la insulina (6 KDa). La insulina que es va generant precipita formant cristalls amb àtoms de zenc presents en el grànul, ocupant el centre; el pèptid-C, més soluble, resta a la perifèria del grànul. El grànul de secreció migrarà cap a la membrana plasmàtica seguint el camí marcat per microtúbuls impulsats per microfilaments que contenen proteïnes contràctils activades per l'entrada de calci a l'interior de la cèl·lula. Posteriorment, el grànul es fusiona amb la membrana plasmàtica mitjançant proteïnes d'adhesió a NSF soluble (SNAREs)<sup>99,235</sup>. Finalment els productes de secreció són alliberats a l'espai extracel·lular per poder dur a terme la seva acció biològica.

1.1.3.- Regulació de la síntesi i secreció d'insulina

La secreció d'insulina està altament regulada. Hi ha diferents factors que regulen aquesta secreció, però la glucosa és el de més importància fisiològica<sup>168</sup>. Tant la síntesi com la secreció d'insulina necessiten la metabolització de la glucosa. Aquesta entra a les cèl·lules  $\beta$  a través del transportador GLUT-2 que donada la seva baixa especificitat i elevada capacitat, les concentracions de glucosa intra i extracel·lulars poden arribar a igualar-se. Un cop a l'interior de la cèl·lula, la glucosa és transformada a glucosa 6-fosfat per l'enzim glucoquinasa i s'inicia la glucòlisi oxidativa generant ATP, equivalents oxidats i reduïts i la mobilització de calci. Quan la relació ATP/ADP augmenta en la cèl·lula beta degut a la metabolització de la glucosa, es tanquen els canals de potassi dependents d'ATP (formats per les subunitats SUR1 i Kir6.2) i es produeix la despolarització de la membrana. Això fa que s'obrin els canals de calci dependents de voltatge<sup>5,180</sup> i que entri el calci extracel·lular que farà que es mobilitzin els grànuls d'insulina cap a la membrana plasmàtica i es secreti la insulina (Fig.3)<sup>114,246</sup>.

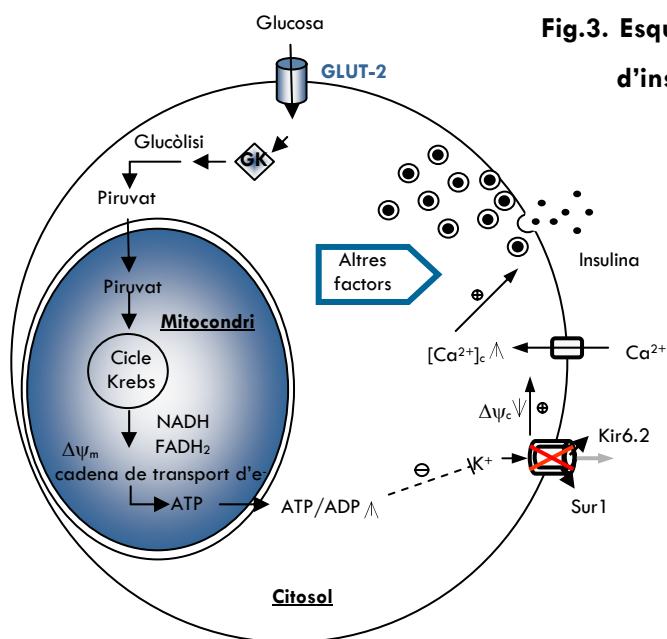


Fig.3. Esquema de la secreció d'insulina.



## 2.- Massa cel·lular beta

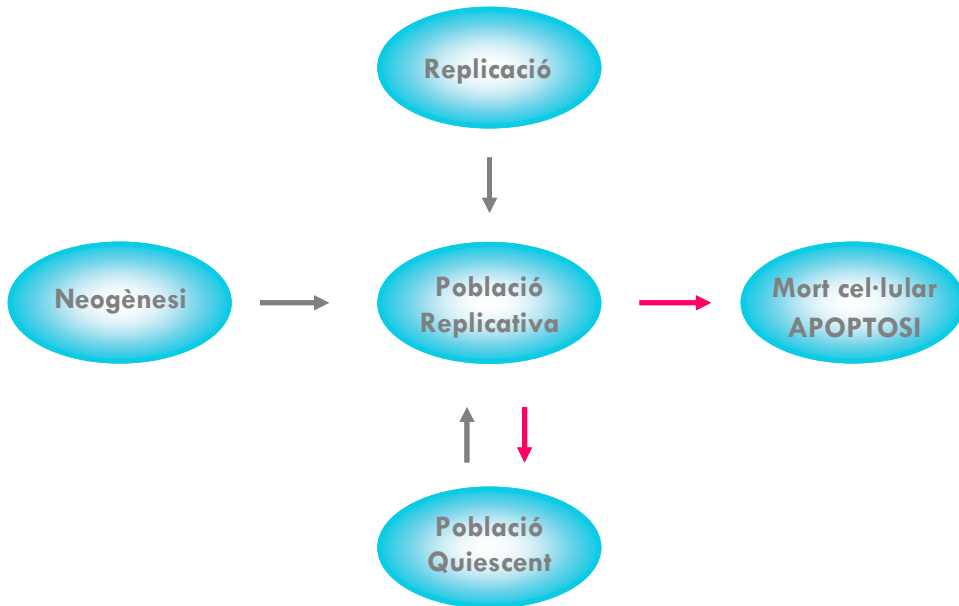
La massa beta pancreàtica és dinàmica, i amb capacitat d'adaptació a les variacions en la demanda metabòlica de l'organisme al llarg de la vida. Els canvis de la massa es poden donar tant per la modificació de la mida de les cèl·lules com del nombre.

### 2.1.- Canvis de la mida de les cèl·lules beta

La regulació de la massa beta per un canvi de la mida de les cèl·lules no és molt conegut. Existeixen diversos estudis que ho demostren, però encara no s'ha descrit el mecanisme pel qual es duu a terme. Un augment en la demanda metabòlica faria augmentar el volum de les cèl·lules beta que juntament amb l'augment de la replicació portarien a un augment de la massa beta. Estudis amb models experimentals demostren que la mida individual de les cèl·lules beta augmenta des del primer mes de vida fins al setè quan s'estabilitzarà per continuar augmentant a partir del quinzè mes<sup>148</sup>. Un exemple de regulació de la massa beta per hipertròfia és l'embaràs, on es dona un augment de la mida de les cèl·lules beta durant la gestació, que disminuirà durant els 10 dies posteriors al part; en aquest cas sembla ser que el lactogen placentari jugaria un paper important<sup>165,166,189</sup>. Els events intracel·lulars que intervenen en aquest procés no són ben coneguts, però estudis recents suggereixen que la proteïna quinasa diana de la rapamicina (m-TOR) i dos dels elements diana d'aquesta, p70<sup>s6K</sup> i 4EBP, podrien estar-hi implicats<sup>44</sup>.

## 2.2.- Canvis del nombre de cèl·lules beta

El nombre de cèl·lules beta es troba en equilibri dinàmic, la quantitat de cèl·lules beta presents en l'organisme dependrà del balanç de la neogènesi, replicació i mort d'aquestes.



**Fig.4. Estat dinàmic del nombre de cèl·lules beta.** Modificat de Bonner-Weir S., et al., Diabetes 2000.

### 2.2.1.- *Neogènesi*

Durant el desenvolupament embrionari l'expansió de la massa cel·lular beta es dona majoritàriament per neogènesi, en canvi en el pàncrees adult aquest procés es dona amb més baixa freqüència, però s'ha descrit que augmenta en casos de pèrdua d'una gran part de la massa beta. En el pàncrees adult, les cèl·lules precursors pluripotencials podrien trobar-se en els ductes pancreàtics, ja que l'epiteli ductal adult conserva la capacitat de generar qualssevol dels tipus cel·lulars presents en el pàncrees. Generalment, les cèl·lules ductals es troben en estat quiescent degut a la

presència de factors inhibidors com per exemple el factor de creixement transformant beta (TGF- $\beta$ )<sup>19</sup>.

Estudis on s'han utilitzat models *in vivo* de regeneració de les cèl·lules beta, com la pancreatectomia parcial o la lligació del ducte pancreàtic, mostren l'activació de processos de neogènesi de cèl·lules insulars a partir de cèl·lules pluripotencials residents en els ductes pancreàtics<sup>213</sup>. També *in vitro*, s'han obtingut cèl·lules insulars a partir del cultiu de ductes pancreàtics humans.

Hi ha alguns estudis que recolzen la hipòtesi de que en els mateixos illots hi ha cèl·lules pluripotencials que podrien diferenciar-se cap a cèl·lula beta en un moment donat<sup>78</sup>. També s'ha proposat que les altres cèl·lules endocrines dels illots poden transdiferenciar-se per generar cèl·lules beta, aquest fenomen s'ha observat en ratolins tractats amb dosis altes d'estreptozotocina<sup>58</sup>. També existeixen evidències de transdiferenciació de cèl·lules del teixit exocrí, que passant per una fase de morfologia aparentment ductal donen lloc a cèl·lules beta. Aquest fenomen s'ha observat en els pàncrees d'animals que han estat infosos crònicament amb una solució de glucosa al 50%<sup>124</sup>.

Finalment, estudis recents demostren l'aparició de cèl·lules productores d'insulina escampades en múltiples òrgans (fetge, teixit adipós, moll de l'os, melsa, timus) d'animals d'hiperglucèmics<sup>119</sup>.

El treball de Dor *i col.*<sup>46</sup>, on mitjançant estudis de marcatge cel·lular han seguit el procés de generació de noves cèl·lules beta en el pàncrees adult, ha posat en dubte la relevància dels processos de neogènesi en la regeneració del pàncrees, proposant que el mecanisme principal pel qual augmenta el nombre de cèl·lules beta en l'organisme adult, és la replicació de les cèl·lules beta existents.

### 2.2.2.- Replicació

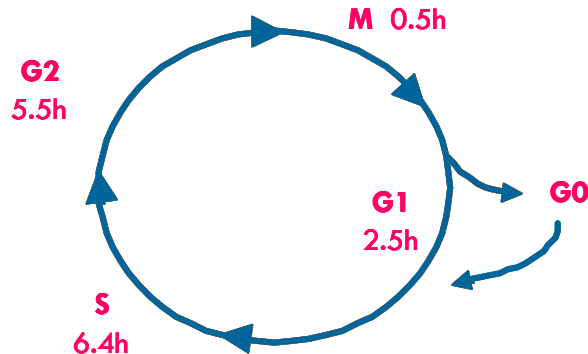
Històricament, les cèl·lules beta pancreàtiques es veien com unes cèl·lules totalment diferenciades incapaces de proliferar. Aquesta premisa va quedar obsoleta quan diversos estudis van demostrar clarament que les cèl·lules beta podien proliferar en resposta a diferents estímuls, tant fisiològics com experimentals, com ara l'embaràs, l'alimentació hipercalòrica, la pancreatectomia o la hiperglucèmia.

La taxa de replicació de les cèl·lules beta dels individus adults és baixa, però està sotmesa a variacions en funció de la demanda metabòlica<sup>20,146</sup> per tal de garantir un bon control glucèmic en situacions extraordinàries.

#### 2.2.2.1.- Progressió del cicle cel·lular de les cèl·lules beta

Les cèl·lules beta pancreàtiques, igual que altres tipus cel·lulars, passen a través de diferents fases del cicle cel·lular.

Ingemar Swenne i Claes Hellerström foren els pioners en l'estudi del cicle de les cèl·lules beta. Swenne mantingué en cultiu uns illots fetals de rata (22 dies de gestació) amb diferents concentracions de glucosa<sup>216</sup>, per tal d'estudiar la durada de les diferents fases del cicle i dels efectes de la glucosa sobre aquest. Basat en aquests estudis va proposar que la durada total del cicle de les cèl·lules beta era de 14.9 hores, subdividit en la fase G1 (2.5 hores), fase S (6.4 hores), fase G2 (5.5 hores) i fase M (0.5 hores)<sup>215</sup>.



**Fig. 5. Esquema del cicle cel·lular de les cèl·lules beta pancreàtiques.** Estan representades les diferents fases del cicle amb la seva durada en el cas de cèl·lules beta d'illots fetals de rata. G0: fase de quiescència o repòs; G1: fase de divisió; S: fase de síntesi de DNA; G2: fase de síntesi proteica; M: mitosi.

Amb aquests estudis també va postular que la glucosa estimulava la proliferació de les cèl·lules provocant l'entrada en cicle d'una fracció limitada de la població de les cèl·lules beta, sense fer variar la durada de les diferents fases del cicle.

Més tard, estudis realitzats amb illots de rates de diferents edats van demostrar que la durada de les diferents fases del cicle cel·lular beta es mantenia independentment de l'edat de l'animal, i també la sensibilitat a la glucosa. Però el nombre de cèl·lules beta que integraven el compartiment proliferatiu disminuïa amb l'edat<sup>217</sup>.

A més de la glucosa, hi ha diversos factors de creixement que intervenen en l'augment de la massa de les cèl·lules beta estimulants la seva replicació. Els més estudiats són els factors de creixement similars a la insulina (IGFs). Els IGFs inclouen l'IGF-1 i IGF-2, aquests dos factors i la insulina comparteixen els receptors però s'hi uneixen amb diferents afinitats. Quan els lligands s'uneixen al seu receptor aquest s'autofosforila creant llocs d'unió per a proteïnes que interactuen amb aquest. Són els substrats del receptor d'insulina (IRS) que interactuen amb el receptor i que un cop

## Introducció

forsforil·lats generen llocs d'unió a proteïnes amb dominis SH2. Actualment hi ha descrits IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4, IRS-5/DOK4, IRS6/DOK5. Els més i millor estudiats en cèl·lules beta són IRS-1 i -2. La diferència principal entre ells radica en que IRS-1 estaria més lligat a un efecte sobre la captació de glucosa i el seu metabolisme, en canvi IRS-2 jugaria un paper més important en la supervivència i proliferació de les cèl·lules beta<sup>244</sup>.

Existeixen diferents treballs on es demostra que els patrons d'expressió d'IGF-1 i 2 són diferents. Durant el desenvolupament embrionari hi ha uns nivells molt elevats d'IGF-2 que correlacionen amb la gran onada replicativa de les cèl·lules beta que té lloc durant aquest període. Aquests nivells es mantenen fins als primers dies després del naixement quan l'expressió local d'IGF-2 cau, fenomen que coincideix amb una onada apoptòtica de les cèl·lules beta<sup>91</sup>. Durant el desenvolupament embrionari els nivells d'IGF-1 són molt baixos, però és l'IGF que predomina en les cèl·lules beta adultes.

Existeixen altres factors implicats en el creixement de les cèl·lules beta pancreàtiques, com el factor de creixement d'hepatòcits (HGF); hormona del creixement (GH), prolactina (PRL) i lactogen placentari (PL); Betacèl·lulina (BTC) o el pèptid similar al glucagó 1 (GLP-1) i el seu anàleg, l'exendina-4.

L'HGF és un factor mesenquimàtic, inicialment identificat com una molècula circulant implicada en la regeneració hepàtica. Estudis recents demostren que tant HGF com el seu receptor (receptor tirosina quinasa codificat pel proto-oncogen c-met) s'expressen en els illots pancreàtics de diverses espècies, i a més s'ha demostrat que HGF és un agent mitogènic i insulinoatròpic, *in vitro*, en les cèl·lules dels illots fetals i adults<sup>158,159</sup>. Per altra banda no està clar que HGF exerceixi aquestes accions en illots humans<sup>116</sup>.

La GH, PRL i PL, han estat extensament estudiades pel que fa al seu efecte mitogènic en les cèl·lules beta pancreàtiques<sup>88-90,196</sup>. Aquesta família d'hormones juguen un paper important en l'augment de la massa beta que es dona durant els períodes d'embaràs i alletament. A més, hi ha estudis que mostren la capacitat de GH per estimular la replicació de les cèl·lules beta tant d'illots fetals, com neonatals, com adults<sup>17,195,197,198,218</sup>.

La Betacel·lulina és un pèptid de 80 aminoàcids que pertany a la família dels factors de creixement epidèrmics (EGFs). S'ha demostrat el seu efecte mitogènic en cèl·lules d'insulinoma de rata<sup>97</sup>, però se'n desconeix el seu mecanisme d'acció i el seu efecte *in vivo*.

GLP-1 és sintetitzat i secretat per les cèl·lules L de l'intestí en resposta a l'absorció oral de glucosa. En rosegadors i humans diabètics, aquesta proteïna potencia la secreció d'insulina en resposta a glucosa a través de la unió amb el seu receptor expressat per les cèl·lules beta. GLP-1 té una vida mitja circulant molt curta, ja que és degradat en plasma per la dipeptidil-peptidasa-IV. En canvi l'exendina-4 és un anàleg estructural de GLP-1 resistent a la degradació de la dipeptidil-peptidasa-IV, i que s'uneix amb gran afinitat al receptor de GLP-1. Estudis realitzats en rates revelen que l'administració d'exendina-4 provoca un increment del 200% de la massa insular<sup>76</sup> degut a un augment de la replicació de la neogènesi<sup>248</sup>.

### 2.2.3.- *Mort*

A l'igual que la massa beta augmenta adaptant-se a increments en la demanda metabòlica per evitar la hiperglucèmia, també disminueix per evitar hipoglucèmies que serien encara més perilloses.

La mort cel·lular és un procés indispensable pel manteniment i regeneració de qualsevol teixit. Clàssicament s'han descrit dos mecanismes diferenciats pels quals la cèl·lula pot morir; un d'actiu i programat, on hi ha despesa d'energia, que s'anomena apoptosi, i un de passiu anomenat necrosi. Aquesta classificació només representa els dos extrems d'una sèrie de processos morfològics i bioquímics que es poden donar quan una cèl·lula mor<sup>118</sup>. Aquests dos tipus de mort es poden donar simultàniament en un mateix teixit o cultiu cel·lular davant un estímul concret, sovint la intensitat i durada de l'estímul conduiran la cèl·lula a morir per apoptosi o per necrosi.

La mort per apoptosi és un procés ràpid controlat genèticament i que requereix energia, ja que implica síntesi de proteïnes. El procés està caracteritzat per un seguit de canvis bioquímics i morfològics.

### 2.2.3.1.- Apoptosi

La mort cel·lular per apoptosi es pot dividir en 3 fases segons els canvis morfològics que hagi experimentat la cèl·lula<sup>27</sup> (Fig. 6):

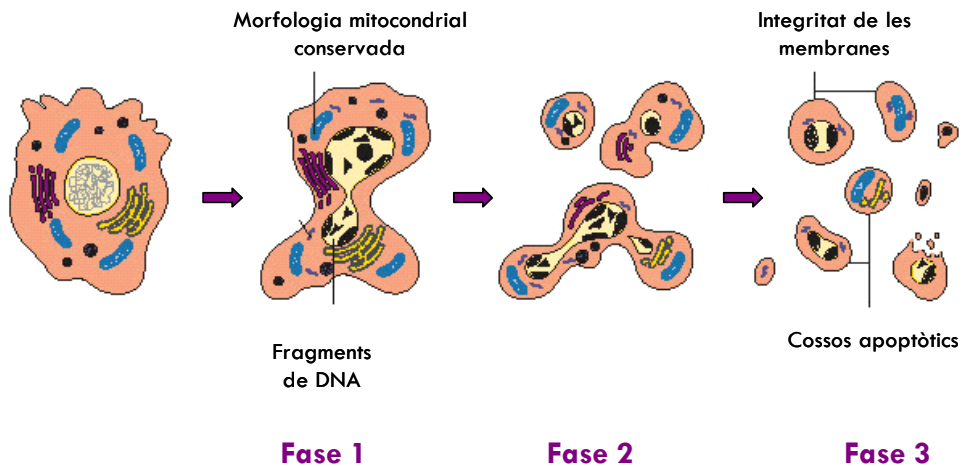
1.- Fase 1: Es produeix una desintegració del nuclèol, condensació de la cromatina, acumulació d'aquesta a la perifèria del nucli i una reducció de la mida del nucli. També es redueix el volum cel·lular augmentant la densitat, una compactació dels orgànuls citoplasmàtics i una dilatació del reticle endoplasmàtic. En aquest punt el mitocondri manté la seva estructura.

2.- Fase 2: Aquesta fase es pot solapar amb l'anterior, la membrana citoplasmàtica perd la seva estructura natural produint-se invaginacions conegudes com "blebbing". En aquest punt es dona la translocació de la fosfatidilserina que és un fosfolípid apolar que es troba en la part interna de la membrana citoplasmàtica. Posteriorment les invaginacions de la membrana s'acaben tancant formant vesícules que contenen components cel·lulars anomenats "cossos apoptòtics". Aquests cossos seran fagocitats per



cèl·lules veïnes, generalment macròfags, i d'aquesta manera s'evita l'alliberament dels continguts intracel·lulars que podrien donar resposta inflamatòria.

3.- Fase 3: Degeneració de les estructures citoplasmàtiques i nuclears residuals. El procés recorda les característiques pròpies de la mort per necrosi, és per això que es coneix amb el nom de necrosi secundària.



**Fig. 6. Esquema del procés de mort cel·lular per apoptosi.** Modificat del catàleg de ROCHE ([www.roche.com](http://www.roche.com))

#### 2.2.3.2.- Necrosi

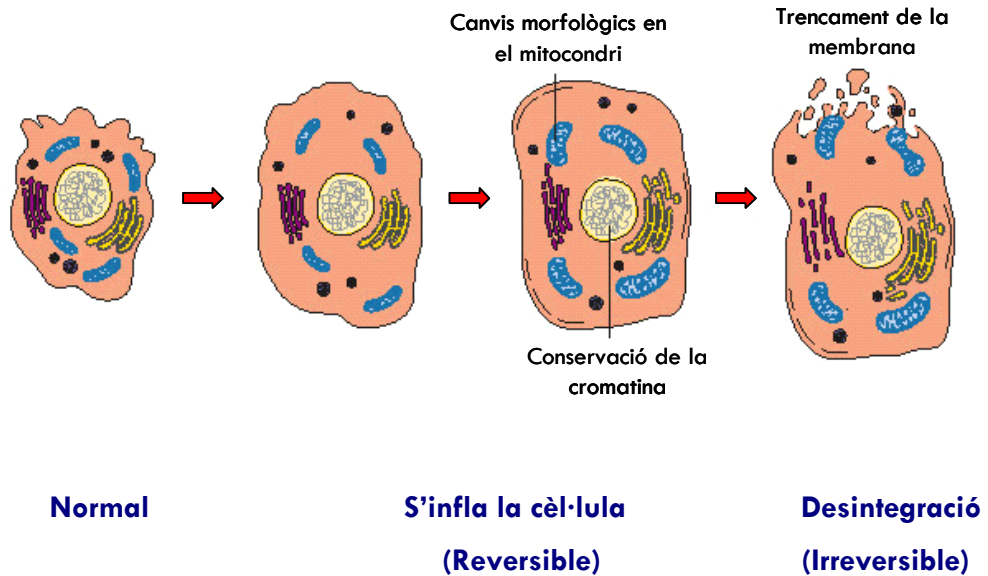
Necrosi és el terme utilitzat per referir-se a la mort accidental de les cèl·lules degut a un dany sever i sobtat com la isquèmia o un trauma físic o químic. Moltes vegades aquest tipus de dany cel·lular afecta zones àmplies de teixit.

La necrosi es caracteritza per canvis irreversibles tant en el nucli com en el citoplasma de les cèl·lules<sup>27</sup> (Fig. 7). Es produeixen uns primers canvis a nivell mitocondrial, provocant una incapacitat per part de la cèl·lula per mantenir l'homeòstasi cel·lular. Els mitocondris s'inflen i apareixen uns

## Introducció

dipòsits densos de lipoproteïnes a la matriu mitocondrial. La membrana plasmàtica és qui pateix un dany més gran, ja que perd la seva habilitat per regular la pressió osmòtica, alterant-se el balanç de calci, sodi i aigua i augmentant el volum cel·lular desmesuradament fins entrar en shock osmòtic<sup>73</sup>. L'acidosi derivada del shock osmòtic provoca una precipitació de la cromatina, però en aquest cas no es dona la marginació de la cromatina cap a la perifèria del nucli ni l'activació de les endonucleases, com es dona en el procés d'apoptosi. Finalment el reticle endoplasmàtic i els lisosomes també s'inflen i exploten alliberant enzims digestius que indueixen la destrucció autolítica de la cèl·lula que acaba trencant-se. Tot el seu contingut intracel·lular és alliberat a l'espai extracel·lular i eliminat pels fagòcits provocant una resposta inflamatòria. Aquesta resposta inflamatòria és necessària per eliminar les restes cel·lulars i començar el procés de reparació cel·lular.

Els canvis bioquímics que es donen durant el procés necròtic estan associats a l'augment de la permeabilitat del mitocondri i de les membranes plasmàtiques, provocant que alguns components surtin de la cèl·lula i altres materials electrodensos s'acumulin a l'interior. Quan les bombes d'ions presents a la membrana no funcionen davant la disminució de l'energia cel·lular, hi ha una aturada del moviment de cations de dins la cèl·lula cap a l'exterior acompanyat per una entrada de fluids que provoca l'inflament de la cèl·lula. L'augment de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  activa fosfolipases que metabolitzaran fosfolípids generant lisofosfolípids i àcids grassos que alteraran la integritat de la membrana. L'acumulació de residus granulars a la matriu mitocondrial s'inicia amb l'excés de calci citosòlic. En un principi es formen dipòsits de calci inorgànic, i en les últimes etapes del procés necròtic ja s'observen proteïnes de la matriu desnaturalitzades. Posterior a la pèrdua de la integritat mitocondrial, hi ha una alteració de l'homeòstasi cel·lular i els lisosomes es trenquen alliberant hidrolases. Aquests enzims causen una ràpida desintegració de la cèl·lula<sup>27</sup>.



**Fig. 7. Esquema del procés de mort cel·lular per necrosi.** Modificat del catàleg de ROCHE. ([www.roche.com](http://www.roche.com))

Tant en el desenvolupament de la Diabetis Mellitus tipus 1 com durant els primers dies després del trasplantament d'illots s'han observat els dos tipus de mort cel·lular en les cèl·lules beta. També en fases avançades de la Diabetis Mellitus tipus 2 s'ha observat un augment de l'apoptosi de les cèl·lules beta, però en aquest cas no s'han detectat zones necròtiques.

Els processos de mort cel·lular, juntament amb la proliferació i neogènesi de les cèl·lules beta, mantenen aquesta població cel·lular en equilibri dinàmic, permetent l'adaptació de la massa beta als requeriments metabòlics de l'individu. Si es dona un desajust entre aquests processos, augmentant la taxa de mort cel·lular en detriment de la proliferació i neogènesi, es produirà una reducció de la massa beta desencadenant intolerància a la glucosa i hiperglucèmia. Aquest fenomen patològic és conegut amb el nom de Diabetis Mellitus.

## 4.- Diabetis Mellitus

La diabetis Mellitus (DM) és una síndrome heterogènia, el fet comú i primari de la qual, la hiperglucèmia, es produeix per diverses causes. En general, es caracteritza per una disminució de la secreció d'insulina i/o un augment de la resistència de la seva acció, resultant-ne un augment de la glucèmia i trastorns en el metabolisme lipídic i proteic.

Ben entrada la dècada dels 70 es van descobrir els anticossos anti-illot pancreàtic (ICA)<sup>23,127</sup>, marcadors immunològics que van permetre distingir un tipus de diabetis autoimmune, on es produïa una destrucció parcial o total de les cèl·lules beta pancreàtiques, la Diabetis Mellitus tipus 1 (DM-1), de la DM-2, un tipus de Diabetis Mellitus no autoimmune caracteritzada per la resistència a la insulina i l'alteració de la funció beta.

### 4.1.- Diabetis Mellitus tipus 1

#### 4.1.1.- Etiopatogènia de la malaltia

La Diabetis Mellitus tipus 1 (DM-1) és una malaltia autoimmunitària que afecta selectivament les cèl·lules beta pancreàtiques productores d'insulina. La destrucció de les cèl·lules beta porta a la insulino-dependència de l'individu afectat. La DM-1 és una malaltia que normalment apareix en individus joves i que afecta a un 0.2 - 0.5% de la població dels països desenvolupats.

Malgrat els avenços en la caracterització de la immunologia de la DM-1, se'n desconeix la causa o el factor desencadenant i tot i que s'han postulat diverses hipòtesis, no es té una visió clara del mecanisme efector final de procés. El que sí que es coneix és que es tracta d'una malaltia amb components de predisposició; s'han identificat factors genètics i ambientals que farien que uns individus fossin més propensos a desenvolupar la DM-1. Entre els factors genètics, els gens que codifiquen per les molècules d'HLA

de classe 2, CTLA4 i insulina han estat associats amb susceptibilitat per desenvolupar DM-1<sup>156</sup>. Per altra banda entre els factors ambientals els possibles candidats són virus, toxines i factors de la dieta.

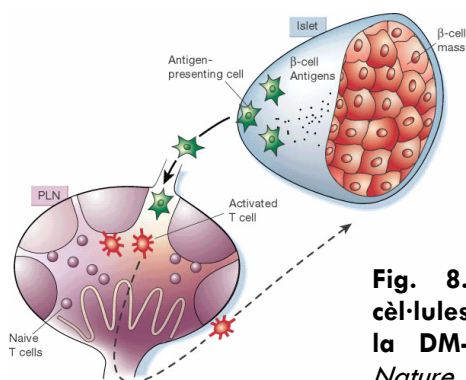
### 3.1.2.- Destrucció de les cèl·lules beta en la DM-1

L'atac selectiu de les cèl·lules beta pel sistema immunitari condueix a que la malaltia es classifiqui com a malaltia autoimmunitària: la immunitat cel·lular i concretament els limfòcits T desenvolupen una tasca rellevant en l'atac i la destrucció de les cèl·lules beta. Prèviament a la destrucció de les cèl·lules beta té lloc la insulinitis, un procés que consisteix en la infiltració dels illots per una barreja de poblacions leucocitàries. Finalment, quan la majoria de les cèl·lules beta han desaparegut i hi ha una producció d'insulina insuficient que impedeix regular els nivells de glucosa, apareix la hiperglucèmia.

La DM-1 és una malaltia conduïda principalment pels limfòcits T<sup>7</sup>. Les anàlisis histològiques mostren que la major part dels leucòcits que infiltrin l'illot durant el procés d'insulinitis són cèl·lules T. Tant el limfòcits CD4<sup>+</sup> (o ajudants) com els CD8<sup>+</sup> (o citotòxics) són presumiblement necessaris pel desenvolupament de la malaltia<sup>7</sup>.

En condicions normals els limfòcits T autoreactius es troben en sang perifèrica i en els òrgans limfoides sense tenir accés als teixits. Quan els antígens derivats de les cèl·lules beta (s'hipotetitza que poden ser la insulina, l'àcid glutàmic descarboxilasa (GAD) o/i tirosina fosfatases) són recollits per les cèl·lules presentadores d'antigen (APCs), s'indueix la seva maduració i migració cap als nòduls limfàtics del pàncrees. Aquí els limfòcits T autoreactius entraran en contacte amb els antígens de les cèl·lules beta activant-se, fet que farà que migrin cap al teixit. Posteriorment els limfòcits T autoreactius reconeixeran els antígens presents en les cèl·lules beta i es

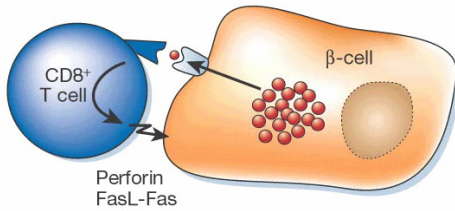
reactivaran iniciant la insulinitis (Fig.8). S'ha proposat que el factor iniciador del procés podria ser una onada apoptòtica de les cèl·lules beta durant el període post-natal, que permetria les APCs recollir i presentar els antígens de les cèl·lules beta<sup>59,135</sup>. Aquest fet tindria conseqüències patològiques per aquells individus amb predisposició per desenvolupar la malaltia, els quals tenen una població limfocitària autoreactiva que podria activar-se davant antígens propis.



**Fig. 8. Atac immunològic de les cèl·lules beta en el desenvolupament de la DM-1.** Mathis D. i col·laborador. *Nature 2000*

Com ja s'ha dit anteriorment, no existeix una única hipòtesi que expliqui com es produeix aquest atac que acaba donant lloc a la destrucció de les cèl·lules beta i l'aparició de la DM-1, però s'han proposat dues hipòtesis dels mecanismes de com es podria donar aquest atac<sup>7,224</sup>.

La primera hipòtesi proposa el reconeixement per part dels limfòcits T citotòxics dels autoantígens que presenten les pròpies cèl·lules beta mitjançant les molècules del Complex Major d'Histocompatibilitat (MHC), provocant la mort de les cèl·lules directament (Fig. 9). Principalment s'ha estudiat la via de la perforina/granzim i/o les interaccions Fas-FasL en la destrucció de les cèl·lules beta per part dels limfòcits T. Aquesta hipòtesi proposa que hi ha d'haver contacte entre les cèl·lules beta i els limfòcits T<sup>77</sup>.



**Fig. 9. Esquema de la destrucció de les cèl·lules beta segons el model de contacte directe cèl·lula-cèl·lula.**

*Mathis D. i col·laborador. Nature 2000*

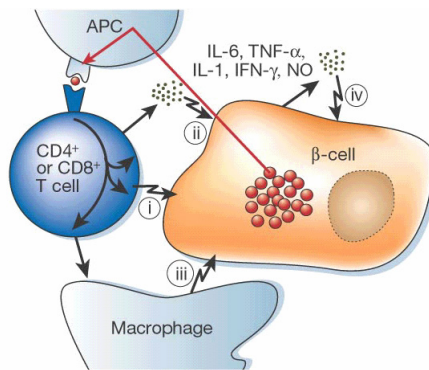
La via de la perforina/granzim és la principal via de mort induïda per limfòcits T citotòxics. La perforina és una molècula associada als grànuls de les cèl·lules citotòxiques que pot inserir-se en la membrana de la cèl·lula diana i formar porus provocant una lisi osmòtica (no apoptòtica). Aquesta hipòtesi està fortament qüestionada, ja que els ratolins NOD transgènics deficientes en perforina desenvolupen diabetis més freqüentment que els corresponents ratolins amb perforina<sup>3</sup>.

Per altra banda Fas s'expressa en gran varietat de tipus cel·lulars i és probablement el principal receptor de membrana que transmet senyals de mort cap a l'interior de la cèl·lula. El FasL (liligand del receptor Fas) és expressat pels limfòcits activats, i la seva unió al receptor Fas desencadena processos de mort per apoptosi de la cèl·lula diana. En estudis *in vitro* s'ha observat que citocines proinflamatorïes com la interleucina 1 (IL-1) estimulen l'expressió de Fas i la seva translocació a la membrana de les cèl·lules beta via NO<sup>204,249</sup>. Estudis *in vivo* mostren que els ratolins NOD deficientes en Fas no desenvolupen diabetis espontàniament i són resistent als limfòcits T diabetogènics<sup>31,98</sup>. Però, per altra banda, anticossos anti-FasL fracassen en la inhibició de la diabetis<sup>109</sup>.

La segona hipòtesi sobre el desenvolupament de la DM1 proposa que la destrucció de les cèl·lules beta es donaria per mediadors citotòxics expressats pels limfòcits T pròxims a les cèl·lules diana (Fig. 10). D'acord amb la hipòtesi, autoantígens de les cèl·lules beta serien recollits per les APCs (macròfags o cèl·lules dendrítiques) residents o reclutades als illots i presentats als limfòcits T CD4<sup>+</sup> reactius. Com a resultat de la interacció

## Introducció

limfòcit T/APCs, els limfòcits T activats destruirien directament les cèl·lules beta veïnes, a través de la perforina, interacció Fas-FasL o bé produint mediadors solubles (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, etc.) que induirien la mort de les cèl·lules beta o activarien els macròfags circumdants. A la vegada, les pròpies cèl·lules beta podrien sintetitzar alguns d'aquests mediadors solubles capaços de participar en el procés de destrucció<sup>130</sup>.



**Fig. 10. Esquema de la destrucció de les cèl·lules beta segons el model d'expressió de citocines.** Mathis D. i col·laborador. *Nature* 2000

Aquests estudis suggereixen que la destrucció de les cèl·lules beta en la DM-1 depèn de la interacció entre macròfags i limfòcits CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> que provoquen una lesió inflammatòria crònica, en la qual les citocines tenen un paper rellevant.



## 3.2.- Diabetis Mellitus tipus 2

### 3.2.1.- Etiopatogènia de la malaltia

El 90% dels casos de Diabetis Mellitus són de l'anomenat tipus 2 (DM-2)<sup>18</sup>. La DM-2 és un trastorn metabòlic caracteritzat per l'aparició d'hiperglucèmia com a conseqüència d'alteracions en la secreció d'insulina i en l'acció d'aquesta al fetge i teixits perifèrics, fonamentalment al múscul.

Si en el cas de la DM-1 hi ha un raonable consens que la malaltia és deguda a una destrucció autoimmune de les cèl·lules beta pancreàtiques secretores d'insulina, l'etiopatogènia de la DM-2 es manté més incerta. Factors genètics i ambientals contribueixen en l'aparició de la malaltia; i l'obesitat és un factor freqüent i fins i tot essencial pel desenvolupament de la malaltia.

La DM-2 es manifesta clínicament quan les cèl·lules beta no poden compensar la resistència a la insulina dels teixits perifèrics augmentant la secreció de l'hormona. Aquest augment de la secreció d'insulina es podria aconseguir fent que cada cèl·lula secretés més insulina, o bé fent augmentar la massa cel·lular beta<sup>21</sup>. Un fet que pot estar agreujant aquesta manca de capacitat de compensar la resistència a la insulina és la reducció de la massa cel·lular beta que s'ha observat en pacients amb DM-2<sup>27</sup>. Cal dir que existeixen alguns estudis que qüestionen aquesta reducció<sup>32,171,205,243</sup>. Per altra banda els pacients també presenten múltiples anomalies en la secreció d'insulina, com ara l'absència de pulsació en la secreció, absència de la primera fase de la secreció i disminució de la segona fase de secreció en resposta a la glucosa o l'augment de la secreció de proinsulina.

Actualment es desconeix quina és l'alteració metabòlica primària; si hi ha una alteració en la pauta normal de la secreció d'insulina o si es tracta d'anomalies en l'acció de la insulina en els teixits perifèrics<sup>220</sup>. Experiments

## Introducció

amb ratolins als que se'ls ha modificat un o més gens per tal de que presentin defectes en la secreció o en l'acció de la insulina<sup>104,145</sup> no han estat del tot esclaridors, però en canvi, han reforçat més la naturalesa multifactorial de la DM-2, ja que demostren que diferents defectes són necessaris per provocar una disfunció suficient per superar els mecanismes de compensació fisiològica i provocar la diabetis.

Malgrat tot s'han postulat algunes hipòtesis per explicar l'evolució de la DM-2<sup>41</sup>. La resistència a la insulina en els teixits perifèrics seria inicialment compensada per un augment de la massa beta deguda a una estimulació de la proliferació de les cèl·lules beta i una major secreció d'insulina. Posteriorment, aquest sobre-esforç de les cèl·lules per secretar més insulina portaria per una banda a un esgotament i secreció defectuosa, i per una altra a un increment de l'apoptosi de les cèl·lules beta. Aquests fenòmens finalment es traduirien en una reducció de la massa beta i diabetis.

Amb tot això podem dir que la DM-2 es caracteritza per una resistència a l'acció de la insulina en els teixits perifèrics i per una mala compensació de la secreció d'insulina per part de les cèl·lules beta pancreàtiques. A més per un augment de l'apoptosi de les cèl·lules beta que acaba provocant la reducció de la massa cel·lular beta<sup>26</sup>.

## 5.- Citocines proinflamatòries i la cèl·lula beta

Com ja s'ha mencionat anteriorment, està àmpliament acceptat que les citocines proinflamatòries juguen un paper molt important en el desenvolupament de la diabetis tipus 1, però sembla ser que també poden ser molt importants en altres processos on hi ha una disfunció de les cèl·lules beta com pot ser la diabetis tipus 2 i el trasplantament d'illots.

Un estudi prospectiu ha mostrat que un patró específic d'expressió de citocines està associat amb un risc elevat de desenvolupar diabetis tipus 2<sup>203</sup>. En concret, uns nivells elevats d'IL-6 i IL-1 $\beta$  circulants, però no d'IL-6 sola, corresponen amb un major risc de desenvolupar diabetis tipus 2. Indicant que la IL-1 $\beta$  podria estar jugant un paper central en el desenvolupament de la DM2. Donant suport a aquesta hipòtesi, un assaig clínic presentat recentment mostra que l'administració de l'antagonista del receptor d'IL-1 (IL-1Ra) a pacients amb DM2 millora el seu estat metabòlic.

En aquesta línia, existeix un treball en el que s'ha observat un increment de l'expressió d'IL-1 $\beta$  en les cèl·lules beta de pacients amb diabetis tipus 2<sup>128</sup>, i on també es mostra que els illots humans exposats a elevades concentracions de glucosa expressen més IL-1 $\beta$ .

Per altra banda, s'ha descrit que en els primers dies després del trasplantament d'illots pancreàtics es dona un procés inflamatori inespecífic, i independent del rebuig que podria estar afectant la viabilitat i funció dels illots trasplantats<sup>15</sup>. Aquesta inflamació inespecífica podria ser un dels causants de la pèrdua de massa beta que té lloc durant aquests primers dies. Resultats previs del nostre grup mostren que hi ha un augment de l'expressió del gen d'IL-1 $\beta$  i iNOS en els primers dies després del trasplantament d'illots singènics<sup>16,149</sup>. Aquests resultats, juntament amb el treball d'Ozasa i els seus col·laboradors<sup>160</sup>, on s'observa un increment de l'expressió d'IL-1 $\alpha$  en els empelts d'illots al·logènics i singènics just després

del trasplantament, i amb el de Gysemans et al.<sup>79</sup> que mostra un augment d'IL-1, TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B i altres citocines en els empelts d'illots xenogènics després de 8h del trasplantament; donen suport a la hipòtesi de que la inflamació no específica que té lloc en els empelts dels primers dies després del trasplantament pot estar afectant negativament la funció i viabilitat de les cèl·lules beta trasplantades i que IL-1 pot tenir un paper molt important.

### 5.1.- Família de la Interleucina 1 (IL-1)

La família d'IL-1 està formada per membres pro i antiinflamatoris. Entre els més destacats i coneguts trobem: els lligands, Interleucina -1 alfa (IL-1 $\alpha$ ), Interleucina -1 beta (IL-1 $\beta$ ), Antagonista del Receptor d'Interleucina 1 (IL-1Ra); els receptors, tipus 1 (IL-1R1) i el de tipus 2 (IL-1R2), ambdós es poden trobar en forma soluble i lligada a la membrana citoplasmàtica; altres proteïnes lligades als receptors, la proteïna accessòria (IL-1RAcP), la proteïna quinasa associada al receptor (IRAK) i l'enzim convertidor d'IL-1 (ICE)<sup>45</sup>.

Els membres d'aquesta família es poden classificar en mediadors proinflamatoris on s'inclouen IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1R1, IL-1RAcP, IRAK i ICE), i en mediadors antiinflamatoris com IL-1Ra i IL-1R2.

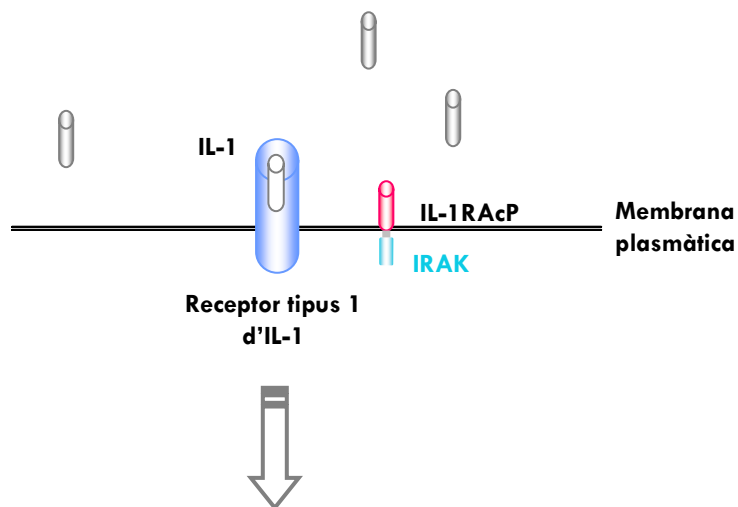
Tant la IL-1 $\alpha$  com la IL-1 $\beta$  es sintetitzen com a precursors glucosilats de 31-33 KDa que poden ser proteolitzats per diferents enzims (col·lagenasa, catepsina, etc) habitualment secretats durant processos inflamatoris, ICE és un enzim que talla específicament el precursor de la IL-1 $\beta$ . Un cop proteolitzats els precursors, en resulta la forma madura de la proteïna que és de 17 KDa. Aquestes proteòlisis es poden donar tant intracel·lular com extracel·lularment.

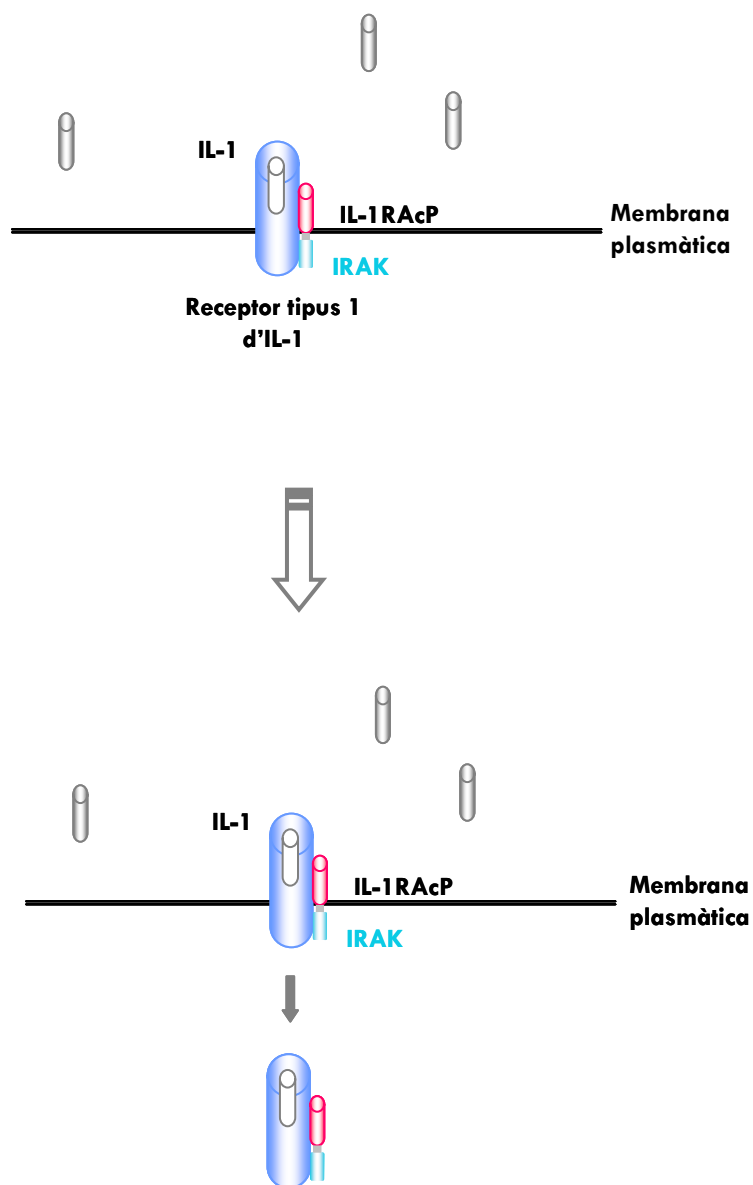
El paper dels precursors d'IL-1 no està del tot definit. En el cas del d'IL-1 $\beta$  no se'n té informació, però s'ha vist que el precursor d'IL-1 $\alpha$  es transloca cap al nucli de les cèl·lules endotelials per tal d'afavorir la seva migració<sup>129,138,242</sup>. També s'ha observat que el receptor tipus 1 reconeix el precursor d'IL-1 $\alpha$  i pot unir-s'hi, però no al precursor d'IL-1 $\beta$ <sup>152</sup>.

El receptor IL-1R1 és l'encarregat de transduir el senyal cap a l'interior de la cèl·lula quan s'hi uneixen IL-1 $\alpha$  o IL-1 $\beta$ . De fet IL-1R1 no actua sol, sinó que forma un complex amb la proteïna accessòria IL-1RAcP i la quinasa IRAK.

Quan IL-1 s'uneix al IL-1R1 interacciona amb el receptor a través de dos dominis fent que aquest canviï de conformació embolcallant el lligant (Fig.11a), això provoca el reclutament de la proteïna accessòria (Fig.11b) per formar el complex actiu que serà internalitzat per iniciar la transducció del senyal i acabar donant l'acció biològica (Fig.11c).

A.



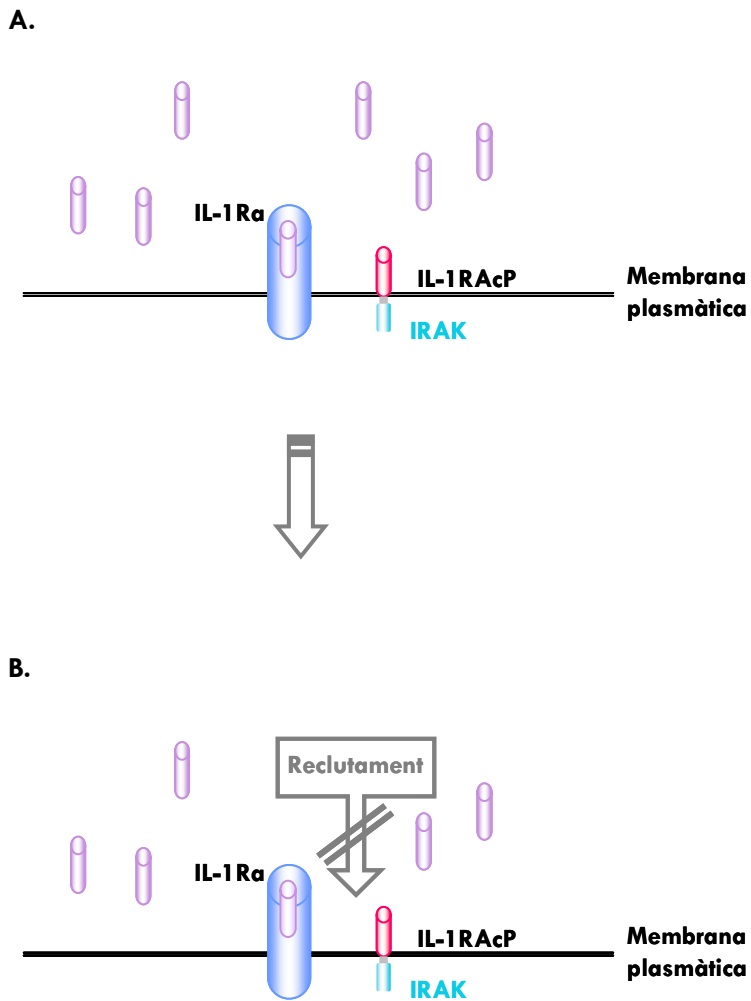


**Fig. 11.** Diagrama del mecanisme d'acció d'IL-1. **A.** Interacció del lligand IL-1 amb el receptor tipus 1. **B.** Reclutament de la proteïna accessòria. **C.** Formació del complex actiu, internalització d'aquest i iniciació de la transducció del senyal.

Per altra banda, entre els agents antiinflamatoris tenim el receptor IL-1R2 que es pot trobar ancorat a la membrana o en forma soluble. A aquest receptor se li uneixen IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  amb elevada afinitat, però IL-1R2 no inicia la transducció del senyal, les citocines que s'hi uneixen s'internalitzen per ser degradades i d'aquesta manera es modula la resposta inflamatòria.

Finalment IL-1Ra és un altre dels membres antiinflamatoris d'aquesta família. Es tracta d'una glucoproteïna de 25 KDa, que presenta una homologia limitada al 19% en la seqüència d'aminoàcids amb la IL-1 $\alpha$  i d'un 26% amb la IL-1 $\beta$ <sup>50</sup>. Després de la seva síntesi, aparentment com a forma madura, ja que no se'n coneix una proforma, és secretada. El mecanisme de secreció d'aquesta proteïna és desconegut, ja que no presenta pèptid senyal. Un cop secretat, l'IL-1Ra pot unir-se tant al receptor tipus 1 com al tipus 2, però ho fa amb diferents afinitats. L'afinitat per unir-se al IL-1R1 és diferent quan aquest receptor es troba ancorat a la membrana citoplasmàtica ( $K_d = 200$  pM) a quan es troba en forma soluble ( $K_d = 70$  pM); d'aquesta manera IL-1Ra segresta els IL-1R1 que es troben en forma soluble per modular la resposta immunològica<sup>214</sup>.

La unió d'IL-1Ra a IL-1R1 és dóna per interacció d'un sol domini, que no és suficient per a que el receptor canviï la seva conformació. Aquest fet impedeix el reclutament de la proteïna accessòria i per tant no es forma el complex actiu. D'aquesta manera no s'inicia la transducció del senyal<sup>193</sup> (Fig. 12).



**Fig. 12.** Diagrama del mecanisme d'acció d'IL-1Ra. **A.** Interacció del lligand IL-1Ra amb el receptor tipus 1. **B.** No es dona el reclutament de la proteïna accessòria, i per tant no hi ha ni formació del complex actiu, ni s'inicia la transducció del senyal.



Aquesta característica fa que IL-1Ra estigui indicat per bloquejar els possibles efectes deleteris de IL-1 sobre diferents tipus cel·lulars.

IL-1Ra ha estat utilitzat en diferents estudis pel seu caràcter antiinflamatori. S'ha descrit que l'administració d'IL-1Ra protegeix els illots xenotrasplantats de la no funció primària<sup>79</sup>, és capaç de prevenir el desenvolupament de diabetis tipus 1 en ratolins NOD<sup>185</sup> i d'evitar l'aparició de diabetis induïda per múltiples injeccions d'estreptozotocina<sup>184</sup>.

## 5.2.- Senyalització intracel·lular d'IL-1

La interacció d'IL-1 amb el seu receptor tipus 1 activa principalment tres vies de transducció de senyal: la via del factor de transcripció NFκB, la de PKC i la de MAPK/P38/JNK. (Fig.11).

Quan IL-1 interacciona amb el seu receptor el complex IL-1/IL-1R1/IL-1RAcP interacciona amb IRAK a través de la proteïna adaptadora MyD88<sup>47</sup>. IRAK interacciona amb el factor 6 associat al receptor de TNF (TRAF6), el qual s'ha proposat que jugaria un paper en l'activació del factor de transcripció NFκB via la quinasa inductora de NFκB (NIK). NIK, per la seva banda, activa la quinasa IKK que fosforila i provoca la degradació de l'inhibidor IκB, permetent l'alliberament de NFκB que transloca al nucli on induïx la transcripció de diferents gens implicats en mort cel·lular com iNOS o Fas<sup>71</sup>.

La interacció d'IL-1 amb el seu receptor tipus 1 també activa PI<sub>3</sub>K<sup>174</sup>. Es creu que aquesta quinasa estaria implicada en l'activació de NFκB i AP-1, a més PI<sub>3</sub>K activa PKB i PKC; la primera estaria implicada en la regulació de la via de NFκB, i la segona, activaria el factor de transcripció C/EBPβ participant en l'activació de respostes de defensa/reparació després de l'exposició a citocines. Cal remarcar que una isoforma de PKC, la PKCδ, és la responsable de l'estabilització del RNA missatger d'iNOS<sup>29</sup>.

Les proteïnes quinasa de la família de P38, SAPK, JNK també estan involucrades en la senyalització d'IL-1. Sembla ser que estarien implicades en l'activació d'alguns factors de transcripció que translocarien a nucli estimulant l'expressió d'alguns gens involucrats en processos de dany cel·lular com l'abans mencionat iNOS. També s'ha vist que aquestes quineses fosforil·len AP-1<sup>53</sup>.

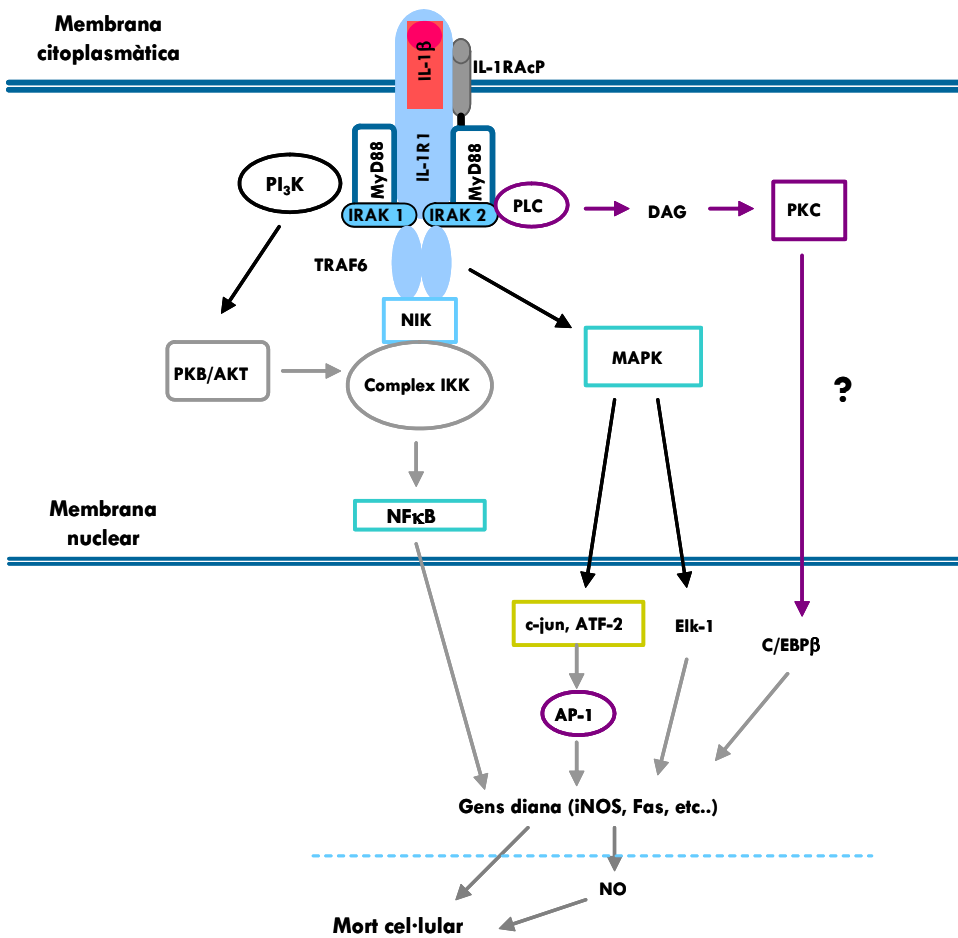


Fig. 11. Senyalització d'IL-1β. Esquema modificat d'Eizirik DL et al 2001

### 5.3.- IL-1 $\beta$ i cèl·lula beta

La citocina proinflamatòria IL-1 $\beta$  té diversos efectes deleteris sobre les cèl·lules beta pancreàtiques. En aquest apartat els separarem entre efectes sobre la funció, viabilitat i proliferació de les cèl·lules beta.

#### *5.3.1.- IL-1 $\beta$ i funció de les cèl·lules beta*

La primera evidència de que les citocines alteraven la secreció d'insulina es va tenir quan es cultivaren els illots amb el sobrenadant de cultius de macròfags i es va veure que la secreció d'insulina estava inhibida<sup>132</sup>. Més tard, es va demostrar que el principal factor inhibidor era la IL-1<sup>11,131</sup>.

També es va observar que els illots exposats a IL-1 $\beta$  presentaven una alteració en el metabolisme mitocondrial<sup>212</sup> i es va demostrar que IL-1 $\beta$  inhibia l'enzim del cicle de Krebs, aconitasa, en els illots de rata<sup>239</sup> i els de ratolí<sup>241</sup>. Aquest fet podria provocar un defecte en el metabolisme de la glucosa conduint a una disminució de la producció d'ATP que comportaria una inhibició de la secreció d'insulina. Això es va demostrar incubant els illots de rata amb IL-1 $\beta$ , ja que es va veure una potent inhibició de l'aconitasa, de la síntesi proteica i de la síntesi i secreció d'insulina<sup>190</sup>. A més, també es va demostrar que els nivells d'ATP queien fins al 40%<sup>188</sup>.

El grau d'inhibició de la secreció d'insulina depèn de les concentracions d'IL-1 $\beta$ , sent màxima (95%) a una concentració de 5 U/ml<sup>96</sup>. Els efectes de la IL-1 $\beta$  sobre la secreció d'insulina també depenen del temps d'exposició a la citocina, ja que una exposició curta (<5h) gairebé no

## Introducció

afecta la secreció, però en canvi exposicions més llargues ( $\geq 18$ h) provoquen una potent inhibició de la secreció d'insulina. Aquesta diferència en el temps d'exposició ens mostra que la inhibició de la secreció d'insulina depèn de la síntesi proteica *de novo*.

Els efectes inhibitoris de la IL-1 $\beta$  sobre la secreció són reversibles. S'ha vist que els illots de rata cultivats durant 15h amb IL-1 $\beta$  requereixen només 4 dies de cultiu amb medi lliure de la citocina per restablir la secreció d'insulina normal<sup>34,161</sup>. A més, sembla ser que aquesta inhibició és específica de les cèl·lules beta, ja que la secreció de glucagó per part de les cèl·lules alfa no queda afectada<sup>122</sup>. Una possible explicació a la toxicitat selectiva de la IL-1 $\beta$ , podria ser que aquesta citocina indueixi l'expressió d'iNOS exclusivament en les cèl·lules beta<sup>51,107</sup> i no en la resta de cèl·lules endocrines de l'illot<sup>211</sup>. L'òxid nítric produït per les cèl·lules inhibeix l'aconitasa afegint-li grups nitrosil en els grups Fe-S del centre actiu de l'enzim, provocant la disminució de l'ATP i la inhibició de la secreció d'insulina estimulada per la glucosa. Els inhibidors de l'iNOS com ara l'aminoguanidina (AG) o el N-mono-metil-L-arginina (NMMA) eviten la inhibició de la secreció d'insulina en cèl·lules exposades a IL-1 $\beta$ <sup>36-38,52,201</sup>. Amb aquestes dades es conclou que la inhibició de la secreció insulina i de la funció metabòlica de l'illot per la IL-1 $\beta$  és predominantment deguda a l'augment de la producció òxid nítric.

Cal remarcar que existeixen diferències importants pel que fa als efectes de la IL-1 $\beta$  sobre els illots de diferents espècies. Els illots de rata són els més sensibles als efectes de la citocina, i es donen tots els processos abans esmentats. En canvi, hi ha certes discrepàncies pel que fa a l'efecte de la IL-1 $\beta$  sobre els illots humans, ja que hi ha estudis on es diu que la IL-

$1\beta$  no només no inhibeix la secreció d'insulina<sup>108</sup>, sinó que la estimula<sup>56</sup>. Però també hi ha treballs que mostren una potent inhibició de la secreció d'insulina, un augment d'òxid nítric i de Fas en els illots humans exposats a la citocina. Aquestes discrepàncies podrien ser degudes a la diferència entre les preparacions d'illots en relació a la composició cel·lular o la concentració hormonal<sup>122</sup>.

### 5.3.2.- *IL-1 $\beta$ i viabilitat de les cèl·lules beta*

Existeixen diversos estudis que descriuen els efectes deleteris de la IL-1 $\beta$  sola o en combinació amb el TNF- $\alpha$  i l'IFN- $\gamma$  sobre la viabilitat de les cèl·lules beta pancreàtiques<sup>54</sup>. L'exposició dels illots de rata a la IL-1 $\beta$  comporta la disminució de la supervivència de les cèl·lules beta<sup>133,137,186</sup>. Aquest efecte no és exclusiu de les cèl·lules beta de l'illot, sino que IL-1 $\beta$  també indueix la mort de les altres cèl·lules endocrines de l'illot<sup>123</sup>. Aquesta mort induïda per IL-1 $\beta$  és tant per apoptosi com per necrosi. S'ha descrit que IL-1 $\beta$  provoca la fragmentació del DNA, característica típica del procés apoptòtic, i també fa augmentar els nivells de ceramides i molècules implicades en la senyalització de l'apoptosi<sup>170,238</sup>. Però a més, també s'ha descrit un augment dels nivells d'òxid nítric en cèl·lules beta exposades a IL-1 $\beta$ , que estaria relacionat amb un augment de necrosi<sup>125,252</sup>.

De la mateixa manera que en el cas dels efectes de la citocina sobre la funció de les cèl·lules beta, els efectes de IL-1 $\beta$  també són diferents entre espècies. És ben sabut que per induir un augment de la mort cel·lular a illots de ratolí cal la combinació de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  que acaben donant tant mort per apoptosi, com per necrosi<sup>93,94,167</sup>. Els illots humans també responen amb aquesta barreja de citocines, però de manera diferent, ja que aparentment la mort induïda per citocines en els illots humans és

majoritàriament per apoptosi<sup>42</sup> i independent d'òxid nítric. Finalment, com ja s'ha comentat anteriorment, IL-1 $\beta$  sola provoca l'entrada en apoptosi de les cèl·lules beta dels illots de rata.

### 5.3.3.- IL-1 $\beta$ i proliferació de les cèl·lules beta

Els efectes d'IL-1 $\beta$  sobre la replicació de les cèl·lules beta no han estat tan detalladament estudiats, però existeixen alguns treballs on es mostren certes evidències de que aquesta citocina podria estar afectant negativament la proliferació de les cèl·lules beta pancreàtiques.

Existeixen estudis on s'observa una disminució de la síntesi de DNA en les cèl·lules d'insulinoma de rata exposades a IL-1 $\beta$ <sup>187,194</sup>. Resultats similars es varen obtenir quan es van exposar illots fetals i adults a la citocina<sup>55,202</sup>.

Així doncs, la IL-1 $\beta$ , citocina proinflamatòria secretada per macròfags activats i limfòcits T infiltrats en el teixit insular durant el desenvolupament de la diabetis tipus 1, altera la funció, disminueix la viabilitat i podria estar alterant la proliferació de les cèl·lules beta pancreàtiques. El conjunt d'aquests efectes impliquen una disfunció i reducció de la massa beta pancreàtica, que si no és compensada per una nova formació de cèl·lules, bé per la proliferació de cèl·lules beta preexistents o per neogènesi a partir de precursors pancreàtics resulta en intolerància a la glucosa i hiperglucèmia.

## 6.- Teràpies per la curació de la diabetis

Actualment el tractament utilitzat en malalts amb diabetis és l'administració d'insulina. Aquest és un tractament pal·liatiu per normalitzar els nivells de glucèmia dels afectats, i tot i que pot ser molt efectiu, l'insuficient control metabòlic generalment aconseguit al llarg de la vida és el responsable de l'aparició de complicacions. Cal dir que amb les pautes del tractament intensificat, alguns malalts obtenen bons controls glucèmics que permeten retardar i en alguns casos fins i tot evitar l'aparició de les complicacions a llarg termini.

Així doncs, l'oportunitat de fer un tractament curatiu contra la diabetis, es centra en la preservació o abastiment d'un nombre necessari de cèl·lules beta.

### 6.1.- Trasplantament

#### 6.1.1- Trasplantament de pàncrees

Fins ara l'única via per restablir la normoglicèmia en malalts de DM-1 a llarg termini havia estat el trasplantament de pàncrees vascularitzat. Actualment el 70-80% dels pacients que reben un trasplantament de pàncrees aconsegueixen la insulino-independència durant un mínim de tres anys i amb la normalització dels nivells d'hemoglobina glucosilada<sup>229</sup>. Durant aquesta última dècada s'ha demostrat que aquest trasplantament millora la qualitat de vida dels pacients i disminueix substancialment el risc d'aparició de complicacions a causa de la diabetis, com són la nefropatia, neuropatia i retinopatia diabètiques<sup>60,154</sup>.

Cal dir que el trasplantament de pàncrees és un complex procediment quirúrgic complex i de risc i que juntament amb la necessitat de tractament immunosupressor resulta preferentment indicat en pacients que necessiten un doble trasplantament, com pot ser el de ronyó.

### 6.1.2.- Trasplantament cel·lular

Donat l'elevat risc que suposa un trasplantament d'òrgan sencer, es va començar a pensar en la possibilitat de trasplantar només les cèl·lules encarregades de sensar la glucosa i de secretar insulina. Un trasplantament cel·lular suposa una intervenció de baix risc que es pot dur a terme en règim quasi ambulatori. A més, aquestes cèl·lules es poden encapsular per protegir-les de l'atac immunològic, i d'aquesta manera evitar la reaparició de l'autoimmunitat i eliminar el tractament immunosupressor.

#### 6.1.2.1.- Trasplantament d'illots pancreàtics

El trasplantament d'illots pancreàtics es va començar a conèixer com a tractament de la diabetis a principis dels anys 70 quan Lacy i els seus col·laboradors van aconseguir normalitzar la glucèmia de ratolins diabètics mitjançant un trasplantament d'illots<sup>9</sup>. Al llarg dels anys 70 i 80 es va intentar aplicar aquest mateix tractament en humans, però sense obtenir cap resultat positiu. Posteriorment, als anys 90 es van aconseguir alguns resultats exitosos, en els quals els pacients que havien rebut un trasplantament d'illots s'havien mantingut normoglicèmics durant més d'un any després de la intervenció<sup>231</sup>. Tot i així el Registre del Trasplantament d'illots informava a l'any 2000 que només el 12% dels trasplantaments d'illots triomfaven en la regulació de la glucèmia i la insulino-independència en algun moment, i que només el 8% dels pacients trasplantats entre els anys 1990-1999 van mantenir-se normoglicèmics durant més d'un any<sup>245</sup>. Va ser a l'any 2000 quan Shapiro i els seus col·laboradors a Edmonton van publicar que el 100% dels 7 pacients amb DM-1 que havien rebut un trasplantament d'illots es van mantenir insulino-independents durant més d'un any<sup>192</sup>. L'estudi d'Edmonton va continuar, i en l'any 2002<sup>181</sup> dels 17 pacients trasplantats 15 ja feia més d'un any que van ser trasplantats i 12 d'ells continuaven sent insulino-independents. 6 pacients dels 15 portaven



més de dos anys trasplantats, i 4 d'ells continuaven sent insulino-independents.

La clau d'aquest èxit es va basar en el trasplantament d'un gran nombre d'illots i en la modificació de la pauta immunosupressora. El nombre d'illots que va rebre cada pacient va ser d'aproximadament 800.000 illots, una quantitat superior a la necessària per restablir la normoglicèmia ja que l'autotrasplantament de 300.000 illots està associat a un 75% d'insulino-independència<sup>221</sup>. La modificació de la pauta immunosupressora també fou una de les responsables d'aquest èxit. En aquest protocol de trasplantament es va utilitzar la dosi habitual de rapamicina (sirolimus), es va afegir un anticòs monoclonal contra el receptor d'IL-2 (daclizumab), es va utilitzar una dosi baixa de tacrolimus i es van suprimir els glucocorticoids. Tant el tacrolimus com els glucocorticoids afecten la supervivència i funció de les cèl·lules beta pancreàtiques i és possible que la combinació d'aquests amb la ciclosporina fos la responsable del fracàs del trasplantament d'illots, ja que aquests fàrmacs s'acumulen al fetge i aquest és l'emplaçament dels illots trasplantats.

Les expectatives generades per aquest èxit han disminuït amb la publicació de l'últim treball del grup d'Edmonton on es resumeix el seguiment dels trasplantaments de 5 anys. En aquest estudi es mostra que només el 10% dels pacients trasplantats es mantenen insulinoindependents, i tot i que la resta presenten nivells de pèptid-C en sang, indicant la permanència de l'empelt, requereixen l'administració d'insulina exògena<sup>182</sup>. De totes formes, la producció d'insulina per part de l'empelt d'illots evita les hipoglicèmies i millora l'estabilitat de la glucèmia, que juntament amb l'administració d'insulina aconsegueix millorar l'estat metabòlic dels individus trasplantats.

La limitada disposició d'òrgans per realitzar l'aïllament i posterior trasplantament d'illots continua sent un dels impediments més importants que limita el trasplantament d'illots. Considerant que a Espanya, el país amb el nombre de donants d'òrgans més elevat del món, es produeixen unes 1.350 donacions al cap de l'any, aquestes són clarament insuficients comparades amb el nombre de malalts amb DM-1 que és de 100.000<sup>147</sup>. A més, la necessitat d'utilitzar de dos a tres pàncrees per trasplantament, donada la baixa eficiència de l'aïllament d'illots, agreuja la situació. Això és degut entre altres coses al component artesanal que encara presenta l'aïllament d'illots, als enzims utilitzats per fer la digestió i al ficoll que s'utilitza per fer els gradients de densitat ja que contenen una certa activitat endotoxina. Aquests tres factors fan que hi hagi molta variabilitat entre els diferents aïllaments en quant a la qualitat, nombre i puresa dels illots.

Estudis realitzats per diversos grups mostren que l'activitat endotoxina present en alguns dels reactius utilitzats durant l'aïllament dels illots pot estimular l'expressió de citocines proinflamatòries<sup>100,101</sup> per part dels macròfags residents en els illots. Aquestes activarien les cèl·lules endotelials afavorint la migració de monòcits i polimorfonuclears que expandirien la resposta inflamatòria local, que a la vegada, podria estar reforçada per la producció d'òxid nítric (NO) per part dels macròfags i altres tipus cel·lulars. El NO, a més, podria provocar la pèrdua de funció de les cèl·lules beta<sup>208,227</sup>.

Tot i que l'obtenció dels illots sigui un procés limitant, no és l'únic responsable de la necessitat d'utilitzar més d'un pàncrees per trasplantar un pacient, ja que després del trasplantament hi ha una gran pèrdua de massa cel·lular beta deguda a dos fenòmens:

1.- Rebuig agut de l'empelt al·logènic. On la pèrdua de l'empelt d'illots es deu a un atac immunològic<sup>178,191</sup> en el que intervindrien les APCs i els limfòcits T CD4<sup>+</sup>, conjuntament amb una barreja de citocines proinflamatòries, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-10 i INF- $\gamma$ <sup>43</sup>.

2.- Pèrdua de funció primària (primary nonfunction, PNF). Ha estat descrit que en els primers dies després del trasplantament els illots no són del tot funcionals, aquest fet s'ha associat a una inflamació no-específica que es produeix en el lloc d'implantació, i a una falta de vascularització dels illots en aquests primers dies. Quan els illots es troben en el pàncrees estan molt vascularitzats (reben un 10% del flux sanguini del pàncrees<sup>121</sup>), i no serà fins aproximadament el dia 10 després del trasplantament que els illots tornin a estar vasculatitzats<sup>140</sup>. Per tant durant aquests primers dies els illots estan sotmesos a hipòxia que no només afecta el metabolisme cel·lular, si no que també la seva viabilitat<sup>39</sup>.

Així doncs el trasplantament d'illots és una teràpia potencialment molt esperançadora, però amb algunes limitacions que han de ser solventades, com l'obtenció d'illots de bona qualitat, evitar la pèrdua de la massa cel·lular beta després del trasplantament i la pauta immunosupressora, que pot ser millorada i fins i tot eliminada en el cas de l'utilització d'illots encapsulats.

#### 6.1.2.2.- Trasplantament de cèl·lules productores d'insulina

Degut a la limitació del teixit del què es disposa per fer trasplantaments d'illots pancreàtics, aquests últims anys s'han fet diversos estudis per obtenir una font de cèl·lules beta "inesgotable". Els estudis s'han focalitzat en dues línies diferents:

## Introducció

- 1.- Generació de línies cel·lulars a partir de cèl·lules beta modificant-les genèticament.
- 2.- Generació de cèl·lules productores d'insulina *in vitro* a partir de cèl·lules progenitores/mare.

### *Expansió de cèl·lules beta diferenciades per immortalització reversible*

La primera d'aquestes línies de treball, es basa en la modificació genètica de les cèl·lules beta madures per tal d'assolir una elevada capacitat proliferativa, ja que al tractar-se de cèl·lules altament diferenciades, l'han perdut. Això s'aconsegueix inserint en el genoma de les cèl·lules un oncogen. Malauradament, s'ha vist que aquesta proliferació forçada de les cèl·lules post-mitòtiques perjudica la producció i secreció d'insulina. A més, unes cèl·lules que repliquen indefinidament, evidentment no són aptes pel trasplantament. Així doncs s'han utilitzat diferents mecanismes per controlar el moment de l'expressió de l'oncogen.

Per una banda existeixen estudis on s'han aconseguit línies de cèl·lules beta murines on l'expressió de l'oncogen està controlada per l'operó de tetraciclina (sistemes "tet-on" " tet-off")<sup>49,61,144</sup>. Aquestes cèl·lules s'expandeixen fàcilment en cultiu i presenten una producció i una secreció d'insulina en resposta a glucosa normals. En el cas de l'estudi on s'utilitzà el sistema "tet-on", el trasplantament d'aquestes cèl·lules als ratolins hiperglucèmics va restablir la normoglucèmia<sup>144</sup>. Cal dir que quan es van intentar reproduir aquests experiments amb cèl·lules beta humanes, tot va resultar ser més complex. El primer impediment va ser que no n'hi va haver prou amb l'expressió d'un oncogen per expandir les cèl·lules, a més, es van haver de modificar les cèl·lules per que expressessin l'enzim telomerasa, ja que si no, les cèl·lules morien ràpidament<sup>81,82</sup>. Aquest problema no el tenen les cèl·lules somàtiques murines, perquè aquestes expressen la telomerasa, i a més, presenten uns telòmers més llargs. El segon impediment fou que les

cèl·lules beta humanes immortalitzades perdien les funcions diferenciades molt més ràpidament que les murines, resultant amb la pèrdua de l'expressió d'insulina i d'importants factors de transcripció. Finalment, un cop solventat el problema de la funció de les cèl·lules beta mitjançant l'expressió del factor de transcripció PDX-1 en combinació amb l'exendina-4, es van trobar amb que els animals que havien estat trasplantats amb aquestes cèl·lules van desenvolupar tumors. Això va ser degut, en part, a que el sistema utilitzat per expressar l'oncogen en aquestes cèl·lules va ser el *cre-loxP*, que resulta ser menys astringent en l'eliminació de l'oncogen que el sistema *tet*, ja que no totes les cèl·lules s'infecten amb el virus que conté el gen *cre* o bé degut a una recombinació incompleta del DNA en les cèl·lules infectades.

Tot i que s'aconseguís millorar l'eliminació de l'oncogen i es convertís en un sistema més fiable, hi hauria una certa recança a l'hora de trasplantar aquestes cèl·lules a humans, primer s'haurien d'assolir nivells de seguretat alternatius, com podria ser la introducció de gens suïcides que permetrien l'eliminació de les cèl·lules en cas de perill.

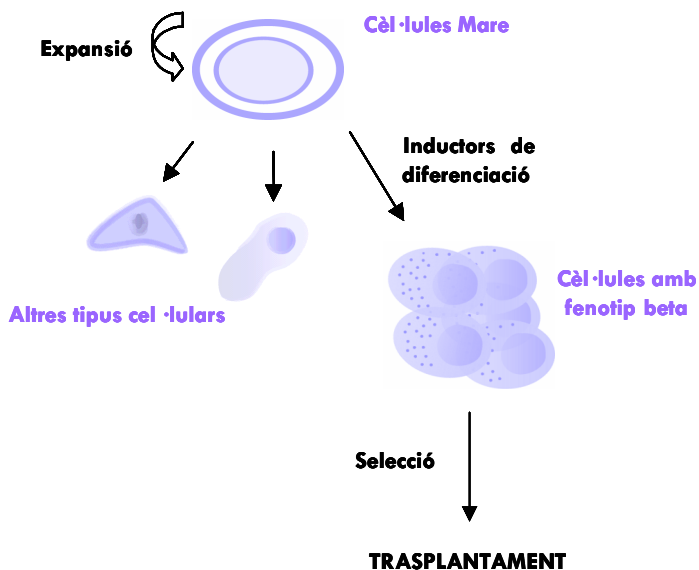
*Generació de cèl·lules productores d'insulina a partir de cèl·lules progenitores*

### **Cèl·lules mare embrionàries**

L'alternativa a la proliferació forçada de cèl·lules madures, és la inducció de la diferenciació de les cèl·lules mare embrionàries, que contenen amb una excel·lent capacitat proliferativa que permet expandir el cultiu per poder diferenciar-les cap a cèl·lules beta productores d'insulina. El desenvolupament de línies de cèl·lules mare embrionàries pluripotencials humanes ha generat grans expectatives i ha obert noves portes a la generació de diversos tipus cel·lulars per fer teràpia cel·lular<sup>222</sup>. Les cèl·lules mare embrionàries es poden propagar en cultiu en condicions determinades

## Introducció

que fan que no es perdi la seva pluripotencialitat. Estudis recents han demostrat que les cèl·lules mare embrionàries tant murines com humanes es diferencien espontàniament generant diferents tipus cel·lulars, entre els que trobem un petit percentatge de cèl·lules beta<sup>6</sup>. Aquestes cèl·lules es poden identificar i seleccionar mitjançant l'expressió d'un gen marcador (tant resistències a antibiòtics, com proteïnes fluorescents, etc.) sota el promotor d'insulina. L'any 2000 Soria i col·laboradors van publicar uns resultats molt esperançadors on demostraven que el trasplantament de cèl·lules productores d'insulina derivades de cèl·lules mare embrionàries de ratolí restablien la normoglicèmia de ratolins diabètics<sup>200</sup>.



**Fig. 12.** Esquema de la possible generació de cèl·lules amb fenotip beta a partir de cèl·lules mare embrionàries. Modificat de *Efrat S. 2002*.

Tot i amb el millor protocol de diferenciació, és molt probable que les cèl·lules productores d'insulina generades en cultiu no siguin exactament iguals que les que trobem en els illots *in vivo*. De fet aquestes cèl·lules podrien plantejar avantatges, ja que no expressarien possibles antígens

desconeguts que són diana en la destrucció immunològica, o bé, podrien expressar més enzims eliminadors de radicals lliures, com ara catalasa o superòxid-dismutasa, ja que sabem que les cèl·lules beta són extremadament sensibles a l'efecte citotòxic de les citocines proinflamatòries, degut a la dificultat d'eliminar els radicals lliures generats<sup>223</sup>.

Si s'aconguessin desenvolupar aquestes cèl·lules amb fenotip beta, es podrien transferir els seus nuclis a cèl·lules del pacient<sup>111</sup>, i d'aquesta manera evitar el trasplantament al·logènic.

### **Cèl·lules pluripotencials de teixits adults**

A més de les cèl·lules mare embrionàries, en els teixits adults s'han trobat cèl·lules pluripotencials amb una gran flexibilitat per transdiferenciar-se en altres tipus cel·lulars després d'un estímul apropiat. Per exemple, les cèl·lules de l'estroma de medul·la òssia tant humanes<sup>33</sup> com de rosegadors, han estat diferenciades cap a neurones<sup>247</sup>, cèl·lules cardíaques i molts altres tipus cel·lulars. Aquestes cèl·lules mare estan presents en diferents teixits adults, i són les responsables de la renovació del teixit que es dona al llarg de la vida. S'ha vist que aquestes cèl·lules pluripotencials no s'expandeixen amb la mateixa facilitat que les cèl·lules mare embrionàries, aquesta característica potser les faria més atractives pel trasplantament, ja que suposarien un menor risc per la seva limitada capacitat proliferativa, però també és una limitació a l'hora de poder generar suficients cèl·lules per restablir la normoglucèmia de l'individu.

Actualment han sortit diversos estudis on es mostra la transdiferenciació de les cèl·lules mare del moll de l'os, intestinals i hepàtiques en cèl·lules amb fenotip beta *in vivo*<sup>115</sup>.

### Cèl·lules pluripotencials pancreàtiques

El lloc obvi per buscar cèl·lules pluripotencials adultes capaces de diferenciar-se a cèl·lules beta pancreàtiques és el propi pàncrees. Estudis realitzats utilitzant models animals de dany pancreàtic, suggereixen que l'epiteli ductal serveix com a font de cèl·lules capaces de generar illots pancreàtics en individus adults. Aquesta podria ser la manera de regenerar els illots al llarg de la vida. Estudis recents mostren la capacitat de les cèl·lules ductals, tant humanes<sup>22</sup> com de ratolí<sup>172</sup>, de diferenciar-se en cèl·lules productores d'insulina en cultiu.

Tot i que aquests resultats són força encoratjadors, existeixen limitacions com la baixa capacitat proliferativa de les cèl·lules ductals i la poca eficiència d'aquestes cèl·lules per diferenciar-se cap a cèl·lules productores d'insulina.



## 6.2.- Teràpia gènica

Durant aquests últims anys s'ha invertit gran quantitat de temps i treball focalitzat en l'ús de vectors virals per millorar genèticament els illots per tal d'evitar el rebuig degut al trasplantament al·logènic<sup>69,70</sup>. Aquests estudis varen despertar molt optimisme entre la comunitat científica pels seus bons resultats, però aviat els ànims varen decaure quan es va apreciar que la supervivència permanent dels empelts d'illots al·logènics no s'aconseguia. En un primer moment, es va pensar que la limitació del procediment era deguda a la immunogènecitat del vector viral, però les evidències més recents suggereixen que la qualitat dels illots pot ser més important que el vector triat a l'hora de determinar el grau d'inflamació assolit a l'interior i al voltant de l'empelt<sup>8,24</sup>.

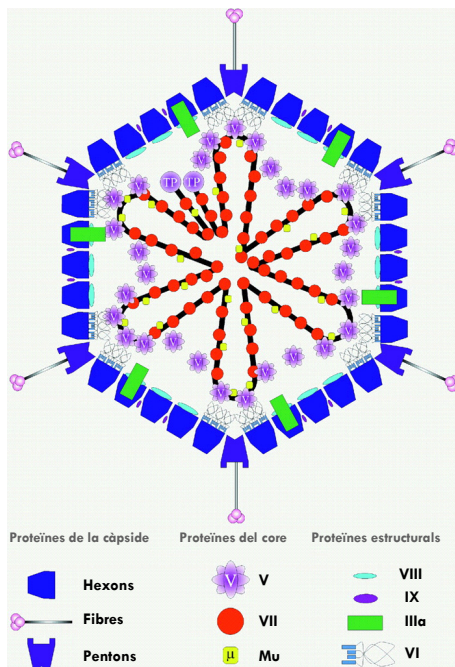
Fins al moment s'han utilitzat diversos vectors d'expressió per transfectar els illots pancreàtics. Entre els que trobem: DNA plasmídic<sup>12,64,65,240</sup>, Adenovirus<sup>1,10,13,35,68,150,228</sup>, Virus adeno-associats<sup>62,106,250</sup>, Retrovirus MoLV<sup>117</sup>, Lentivirus<sup>66,67,103</sup>, Herpes Simplex Virus<sup>126,169</sup>, Liposomes catiónics<sup>183,240</sup> i Dominis de fusió de pèptids<sup>57,142,175</sup>. En la taula adjunta es mostren les característiques dels vectors amb la seva aplicabilitat per transfectar illots i els seus *pros i contres*.

TIPUS DE VECTOR	TRANSDUCCIÓ ESTABLE	ESTAT CEL·LULAR REQUERIT	IMMUNOGÈNIC	TRANSDUCCIÓ D'ILLOTS?	PROS	CONTRES
DNA plasmídic	No	En divisió / Quiescents	Si	Rosegador / Humans	Fàcil de generar, créixer i purificar; variants multicistronòniques fàcils de generar	Poca persistència, cèl·lules diana no específiques, poca difusió en el teixit
Adenovirus	No	En divisió / Quiescents	Si	Rosegador / Humans	Ha estat el vector triat per experiments pilot; s'obtenen titulacions elevades fàcilment; gairebé totes les cèl·lules i teixits són transduïbles	Immunogènic in vivo; transducció no estable
Virus Adeno-associats	Possible	En divisió / Quiescents	Menor	Humans	Integració en lloc específic i estable; gairebé no és immunogènic; infecta molts tipus cel·lulars diferents	El temps d'expressió del transgen pot ser de l'ordre de dies
Retrovirus MoLV	Si	En divisió	No	Rosegador / Humans (poc utilitzat)	Integració estable en cèl·lules que es divideixen ràpidament; es poden obtenir bones titulacions	L'expressió del gen és sensible al lloc d'integració, a metilacions i efectes de les citocines
Lentivirus	Si	En divisió / Quiescents	No	Rosegador / Humans	No immunogènic, d'integració estable; es poden obtenir bones titulacions	Certa perillositat en vectors derivats de HIV-1
Virus Herpes simplex tipus 1	No	En divisió / Quiescents	Toxicitat inherent	Humans	Molt genoma disponible per cistrons de grans dimensions; bona persistència en molts tipus cel·lulars	Toxicitat inherent
Liposomes catiónics	No	En divisió / Quiescents	No	Humans	Manipulació senzilla per introduir DNA en gairebé tots els tipus cel·lulars i teixits. No immunogènic, no té tropisme per un tipus cel·lular concret	Poca difusió
Dominis de fusió de pèptids	No	En divisió / Quiescents	No	Humans / Rosegador	Són traduïbles molts tipus cel·lulars; s'introdueixen pèptids intactes; no està subjecte a regulació gènica; es poden aconseguir elevats nivells de proteïna, no s'ha descrit immunogenicitat	Vida mitja curta; subjecte a degradació proteolítica; per obtenir-ne grans quantitats requereix cert esforç

## 6.2.1- Adenovirus

### 6.2.1.1.- Característiques generals

Els adenovirus estan formats per una càpside icosaèdrica formada per 3 proteïnes majoritàries, hexons, pentons i fibres<sup>210</sup>. La combinació d'aquestes tres proteïnes forma un capsòmer, i la càpside està formada per diversos capsòmers. Els polipèptids V, VIII i IX estan associats amb l'hexó i sembla ser que li confereix estabilitat; a més els polipèptids VI i VIII fan de pont entre la càpside i els components del *core*. El polipèptid IIIa està associat amb els hexons que envolten els pentons, i fa de pont entre els hexons i el polipèptid VII del *core*. El polipèptid VII del *core*.



El genoma del virus és lineal i està format per una doble cadena de DNA amb una proteïna (TP) unida covalentment a l'extrem 5' terminal<sup>176</sup> que té repeticions terminals invertides (ITRs). El DNA està íntimament associat al pèptid VII i a *mu*<sup>4</sup>. El polipèptid V també està empaquetat amb el genoma del virus i li confereix una unió estructural amb el polipèptid VI de la càpside<sup>136</sup>. El virus també conté una proteasa (Pr) necessària pel processament d'algunes proteïnes estructurals per produir virus infecciosos madurs<sup>232 48,236</sup>.

Els membres de la família dels adenovirus (*Adenoviridae*) infecten una gran varietat de cèl·lules post-mitòtiques, fins i tot aquelles presents en teixits altament diferenciats. Degut a que alliberen el seu genoma en el nucli de la cèl·lula infectada i poden replicar amb elevada eficiència, estan considerats

com a molt bons candidats per l'expressió i alliberament de gens terapèutics.

### 6.2.1.2.- Infecció amb adenovirus

L'adsorció del virus a la membrana citoplasmàtica de la cèl·lula diana requereix una elevada afinitat, és per això que en un primer moment es va pensar que el virus havia d'interaccionar amb algun receptor de membrana. El receptor principal amb el que interacciona adenovirus és el mateix que utilitza Coxsackie virus per infectar, que és l'anomenat *coxsackie/adenovirus receptor* (CAR)<sup>14</sup>. El CAR és una proteïna transmembrana de 46 KDa que pertany a la superfamília de les immunoglobulines, i que el seu domini extracel·lular interacciona amb la proteïna de la fibra d'adenovirus afavorint l'adsorció dels virus<sup>230</sup>.

Després de la interacció inicial entre el virus i la cèl·lula, aquest entra via endocitosi mediada per clatrina<sup>209</sup>. S'ha vist que els pentons interaccionen amb les integrines  $\alpha_V\beta_3$  i  $\alpha_V\beta_5$  que els hi faciliten la internalització cap al nucli<sup>141</sup>. Un cop el virus arriba al nucli comença la transcripció del seu genoma que consta de gens primerencs (E1, E2, E3 i E4) i gens tardans (L1, L2, L3, L4 i L5).

Les proteïnes codificades pels gens E1 (E1A i E1B) tenen una funció antiapoptòtica que pretenen protegir la cèl·lula d'atacs immunològics (immunitat innata) i d'activacions de cascades proapoptòtiques com les que inclouen NF $\kappa$ B, p53 o Bax<sup>83,87,233</sup>. Aquestes proteïnes també són importants per la replicació dels virions<sup>179</sup> i pel transport dels RNAs vírics<sup>95</sup>.

E2 codifica per la maquinària replicativa del DNA del virus i assegura la transcripció dels gens tardans<sup>28</sup>.

E3 codifica per proteïnes que ajuden el virus a protegir-se dels mecanismes de defensa de l'hoste, i per facilitar la citòlisi per alliberar els nous virions formats<sup>226</sup>. S'ha descrit que E3 codifica per RID $\alpha$  i RID $\beta$  que eliminen Fas de la membrana plasmàtica de la cèl·lula hoste per després

degradar-lo<sup>225</sup> i que E3 gp 19K és capaç de retenir els complexos MHC-antigen en el reticle endoplasmàtic evitant la seva translocació a la membrana plasmàtica i així eludir de ser reconeguda pels limfòcits T<sup>113</sup>.

Finalment, E4 codifica per proteïnes que afavoreixen el metabolisme del RNA missatger viral<sup>72</sup> i promou la replicació del DNA viral i l'aturada de la síntesi proteica de les proteïnes en la cèl·lula hoste<sup>80</sup>. Els productes d'E4 també inhibeixen la citòlisi de la cèl·lula hoste pels limfòcits T. En aquests últims anys també s'ha descrit una possible interacció entre les proteïnes codificades per la regió E4 i la proteïna quinasa activada pel DNA, prevenint la concatenació del DNA viral. Aquesta quinasa és necessària per activar p53 en cas de dany al DNA, per això s'ha hipotetitzat que E4 podria estar inhibint l'apoptosi de la cèl·lula hoste inhibint l'activació de p53<sup>25,237,134</sup>.

Per la replicació del DNA viral es requereixen les terminacions finals invertides, ja que funcionen com orígens de replicació<sup>86</sup>. Finalment, els gens tardans codifiquen per proteïnes estructurals i relacionades amb l'encapsidació i maduració dels virions en el nucli.

### 6.2.1.3.- Adenovirus com a vectors d'expressió

En la primera generació dels vectors d'adenovirus, es varen delectonar les regions E1 i E3, permetent la introducció de DNA extern de fins a 6.5 Kb. La delectió d'E1 té l'avantatge de que a més de que s'anul·la l'expressió de les proteïnes codificades per aquesta regió, també s'impedeix l'expressió de les proteïnes de la regió E2, ja que aquesta depèn d'E1.

Aquests adenovirus recombinants poden propagar-se en les cèl·lules 293<sup>75</sup> que proveeixen les proteïnes codificades per la regió E1 en *trans*.

En la segona generació dels vectors d'adenovirus es va eliminar la regió E2, ja que s'havia vist que quan s'utilitzava una elevada multiplicitat d'infecció (MOI), E2 s'acabava expressant tot i que E1 estés deletat, generant-se adenovirus replicatius (RCA; Replicative-Competent Adenovirus) provocant la mort de les cèl·lules de l'hoste que s'agreujava amb la inexistència de les proteïnes E1 que com s'ha explicat anteriorment juguen un paper important en la inhibició de l'apoptosi de les cèl·lules infectades.

Finalment, la tercera generació d'adenovirus ha donat lloc a vectors més sofisticats, als quals se'ls ha deletat tot o gairebé tot el seu genoma, aquests s'anomenen vectors "gutless"<sup>2</sup>. Aquests vectors només mantenen intactes les regions ITR i seqüències d'empaquetament, i necessiten un virus *helper* i unes cèl·lules complementàries per la seva propagació, que haurà d'anar seguida d'una purificació meticulosa per poder eliminar les restes de virus *helper*<sup>84,112,120,207</sup>. De totes maneres hi ha problemes associats a la inestabilitat del vector i a la contaminació del virus *helper*. S'han descrit noves estratègies per prevenir l'empaquetament del *helper* que consisteixen en l'ús de sistemes *Cre-lox*<sup>30,85,155,163,219</sup>.

Un factor important per millorar l'estabilitat del vector "gutless" és mantenir la mida del vector per tenir un empaquetament de DNA eficient<sup>164</sup>. Això s'ha aconseguit afegint DNA no codificant per mimetitzar la llargada del genoma de l'adenovirus salvatge, però s'ha vist que aquest segment afegit pot influir en l'expressió del transgen<sup>162</sup>. Aquests vectors han aconseguit augmentar de manera molt important l'expressió del transgen *in vivo*<sup>102,151</sup>. Per altra banda, sembla ser que mantenir alguns dels gens de la regió E4 millora la supervivència del vector, ja que evita la resposta dels limfòcits T<sup>74,105</sup>.

A banda dels avenços de modificar els serotip d'adenovirus que infecten els humans, s'ha estat treballant amb adenovirus derivats d'altres

espècies (aviars, ovines, bovines, canines) per fer teràpia gènica en humans, ja que aquests no solen activar la resposta humoral<sup>92,110,143,173,251</sup>.

#### 6.2.1.4.- Adenovirus i l'illot pancreàtic

Durant aquests últims anys els vectors adenovirals han estat molt utilitzats per introduir gens exògens a les cèl·lules de l'illot. Aquests vectors han demostrat tenir una molt bona eficiència de la infecció de les cèl·lules de l'illot, i tot i que majoritàriament arriba a les cèl·lules de la perifèria de l'illot, s'ha aconseguit una certa penetració del virus per poder infectar les cèl·lules de l'interior que en el cas dels illots de rosegadors acostumen a ser les cèl·lules beta.

Tot sembla apuntar que els adenovirus són bons vectors d'expressió per transfectar cèl·lules *ex vivo* que posteriorment seran implantades a un receptor. Existeixen estudis en el que es mostra que quan s'infecten illots a baixes MOI (fins a 100), la viabilitat dels illots es manté, a l'igual que la funció de les cèl·lules beta. En canvi quan s'utilitzen quantitats més elevades de virus, aquests comencen a provocar efectes deleteris sobre la funció i viabilitat de les cèl·lules de l'illot<sup>234</sup>.

Tot i que l'expressió del transgen introduït mitjançant un vector adenoviral sigui transitòria, ha estat descrit que l'expressió d'un gen marcador ( $\beta$ -galactosidasa) continua present en els illots trasplantats com a mínim fins 140 dies després del trasplantament<sup>153</sup>.





1. Alexander,A.M. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD Islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes. *Diabetes* 51, 356-365 (2002).
2. Amalfitano,A. et al. Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *J. Virol.* 72, 926-933 (1998).
3. Amrani,A. et al. Perforin-independent beta-cell destruction by diabetogenic CD8(+) T lymphocytes in transgenic nonobese diabetic mice. *J. Clin. Invest* 103, 1201-1209 (1999).
4. Anderson,C.W., Young,M.E. & Flint,S.J. Characterization of the adenovirus 2 virion protein, mu. *Virology* 172, 506-512 (1989).
5. Ashcroft,F.M. et al. Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *J. Cell Biochem.* 55 Suppl, 54-65 (1994).
6. Assady,S. et al. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 50, 1691-1697 (2001).
7. Bach,J.F. & Mathis,D. 70th forum in immunology: the NOD mouse. *Research in Immunology* 148, 281-370. 1997.
8. Balamurugan,A.N., Chang,Y., Fung,J.J., Trucco,M. & Bottino,R. Flexible management of enzymatic digestion improves human islet isolation outcome from sub-optimal donor pancreata. *Am. J. Transplant.* 3, 1135-1142 (2003).
9. Ballinger,W.F. & Lacy,P.E. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 72, 175-186 (1972).
10. Becker,T.C., BeltrandelRio,H., Noel,R.J., Johnson,J.H. & Newgard,C.B. Overexpression of hexokinase I in isolated islets of Langerhans via recombinant adenovirus. Enhancement of glucose metabolism and insulin secretion at basal but not stimulatory glucose levels. *J. Biol. Chem.* 269, 21234-21238 (1994).
11. Bendtzen,K. et al. Cytotoxicity of human pl 7 interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. *Science* 232, 1545-1547 (1986).
12. Benhamou,P.Y. et al. Standardization of procedure for efficient ex vivo gene transfer into porcine pancreatic islets with cationic liposomes. *Transplantation* 63, 1798-1803 (1997).

## Bibliografia introducció

13. Benhamou,P.Y., Mullen,Y., Shaked,A., Bahmiller,D. & Csete,M.E. Decreased alloreactivity to human islets secreting recombinant viral interleukin 10. *Transplantation* 62, 1306-1312 (1996).
14. Bergelson,J.M. et al. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275, 1320-1323 (1997).
15. Biarnes,M. et al. Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes* 51, 66-72 (2002).
16. Biarnés,M., Montolio,M., Téllez,N., Soler,J. & Montanya,E. Apoptosis and IL-1 mRNA expression in syngeneic rat islet grafts. *Diabetologia Suppl(40 th Annual Meeting of the European Association for the study of Diabetes)*. 2001.

Ref Type: Abstract

17. Billestrup,N. & Nielsen,J.H. The stimulatory effect of growth hormone, prolactin, and placental lactogen on beta-cell proliferation is not mediated by insulin-like growth factor-I. *Endocrinology* 129, 883-888 (1991).
18. Birnbaum,M.J. Turning down insulin signaling. *J. Clin. Invest* 108, 655-659 (2001).
19. Bonner-Weir,S. Islet growth and development in the adult. *J. Mol. Endocrinol.* 24, 297-302 (2000).
20. Bonner-Weir,S., Deery,D., Leahy,J.L. & Weir,G.C. Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes* 38, 49-53 (1989).
21. Bonner-Weir,S., Scaglia,L., Montana,E., Juang,J.H. & Weir,G. *Diabetes* 1994. Baba,S. & Kaneko,T. (eds.), pp. 179-228 (*Excerpta Medica International Congress,1995*).
22. Bonner-Weir,S. et al. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 7999-8004 (2000).
23. Bottazzo,G.F., Florin-Christensen,A. & Doniach,D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 2, 1279-1283 (1974).

24. Bottino,R., Trucco,M., Balamurugan,A.N. & Starzl,T.E. Pancreas and islet cell transplantation. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 16, 457-474 (2002).
25. Boyer,J., Rohleder,K. & Ketner,G. Adenovirus E4 34k and E4 11k inhibit double strand break repair and are physically associated with the cellular DNA-dependent protein kinase. *Virology* 263, 307-312 (1999).
26. Butler,A.E. et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102-110 (2003).
27. Cameron,R. & Feuer,G. Apoptosis and its modulation by drugs. Heidelberg (2000).
28. Caravokyri,C. & Leppard,K.N. Human adenovirus type 5 variants with sequence alterations flanking the E2A gene: effects on E2 expression and DNA replication. *Virus Genes* 12, 65-75 (1996).
29. Carpenter,L., Cordery,D. & Biden,T.J. Protein kinase Cdelta activation by interleukin-1beta stabilizes inducible nitric-oxide synthase mRNA in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* 276, 5368-5374 (2001).
30. Chen,L., Anton,M. & Graham,F.L. Production and characterization of human 293 cell lines expressing the site-specific recombinase Cre. *Somat. Cell Mol. Genet.* 22, 477-488 (1996).
31. Chervonsky,A.V. et al. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell* 89, 17-24 (1997).
32. Clark,A. et al. Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Res.* 9, 151-159 (1988).
33. Colter,D.C., Sekiya,I. & Prockop,D.J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 7841-7845 (2001).
34. Comens,P.G., Wolf,B.A., Unanue,E.R., Lacy,P.E. & McDaniel,M.L. Interleukin 1 is potent modulator of insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* 36, 963-970 (1987).

## Bibliografia introducció

35. Contreras, J.L. et al. Gene transfer of the Bcl-2 gene confers cytoprotection to isolated adult porcine pancreatic islets exposed to xenoreactive antibodies and complement. *Surgery* 130, 166-174 (2001).
36. Corbett, J.A., Kwon, G., Misko, T.P., Rodi, C.P. & McDaniel, M.L. Tyrosine kinase involvement in IL-1 beta-induced expression of iNOS by beta-cells purified from islets of Langerhans. *Am. J. Physiol* 267, C48-C54 (1994).
37. Corbett, J.A. & McDaniel, M.L. Intra-islet release of interleukin 1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 181, 559-568 (1995).
38. Corbett, J.A., Wang, J.L., Sweetland, M.A., Lancaster, J.R., Jr. & McDaniel, M.L. Interleukin 1 beta induces the formation of nitric oxide by beta-cells purified from rodent islets of Langerhans. Evidence for the beta-cell as a source and site of action of nitric oxide. *J. Clin. Invest* 90, 2384-2391 (1992).
39. Davalli, A.M. et al. Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period. Dynamic changes in structure and function. *Diabetes* 45, 1161-1167 (1996).
40. Davies, P.O., Poirier, C., Deltour, L. & Montagutelli, X. Genetic reassignment of the insulin-1 (*Ins1*) gene to distal mouse chromosome 19. *Genomics* 21, 665-667 (1994).
41. DeFronzo, R. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes reviews* 5, 177-269 (1997).
42. Delaney, C.A., Pavlovic, D., Hoorens, A., Pipeleers, D.G. & Eizirik, D.L. Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. *Endocrinology* 138, 2610-2614 (1997).
43. Diamond, A.S. & Gill, R.G. An essential contribution by IFN-gamma to CD8+ T cell-mediated rejection of pancreatic islet allografts. *J. Immunol.* 165, 247-255 (2000).
44. Dickson, L.M. & Rhodes, C.J. Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 287, E192-E198 (2004).
45. Dinarello, C.A. Interleukin-1. *Adv. Pharmacol.* 25, 21-51 (1994).

46. Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I. & Melton, D.A. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429, 41-46 (2004).
47. Dupraz, P. et al. Dominant negative MyD88 proteins inhibit interleukin-1beta /interferon-gamma -mediated induction of nuclear factor kappa B-dependent nitrite production and apoptosis in beta cells. *J. Biol. Chem.* 275, 37672-37678 (2000).
48. Duvillie, B., Bucchini, D., Tang, T., Jami, J. & Paldi, A. Imprinting at the mouse *Ins2* locus: evidence for cis- and trans-allelic interactions. *Genomics* 47, 52-57 (1998).
49. Efrat, S., Fusco-DeMane, D., Lemberg, H., al Emran, O. & Wang, X. Conditional transformation of a pancreatic beta-cell line derived from transgenic mice expressing a tetracycline-regulated oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 3576-3580 (1995).
50. Eisenberg, S.P. et al. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* 343, 341-346 (1990).
51. Eizirik, D.L. Interleukin-1 beta induces an early decrease in insulin release, (pro)insulin biosynthesis and insulin mRNA in mouse pancreatic islets by a mechanism dependent on gene transcription and protein synthesis. *Autoimmunity* 10, 107-113 (1991).
52. Eizirik, D.L., Bjorklund, A. & Welsh, N. Interleukin-1-induced expression of nitric oxide synthase in insulin-producing cells is preceded by c-fos induction and depends on gene transcription and protein synthesis. *FEBS Lett.* 317, 62-66 (1993).
53. Eizirik, D.L. & Mandrup-Poulsen, T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 44, 2115-2133 (2001).
54. Eizirik, D.L. & Pavlovic, D. Is there a role for nitric oxide in beta-cell dysfunction and damage in IDDM? *Diabetes Metab Rev.* 13, 293-307 (1997).
55. Eizirik, D.L., Welsh, M., Strandell, E., Welsh, N. & Sandler, S. Interleukin-1 beta depletes insulin messenger ribonucleic acid and increases the heat shock protein hsp70 in mouse pancreatic islets without impairing the glucose metabolism. *Endocrinology* 127, 2290-2297 (1990).

## Bibliografía introducció

56. Eizirik,D.L., Welsh,N. & Hellerstrom,C. Predominance of stimulatory effects of interleukin-1 beta on isolated human pancreatic islets. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 76, 399-403 (1993).
57. Embury,J. et al. Proteins linked to a protein transduction domain efficiently transduce pancreatic islets. *Diabetes* 50, 1706-1713 (2001).
58. Fernandes,A. et al. Differentiation of new insulin-producing cells is induced by injury in adult pancreatic islets. *Endocrinology* 138, 1750-1762 (1997).
59. Finegood,D.T., Scaglia,L. & Bonner-Weir,S. Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 44, 249-256 (1995).
60. Fioretto,P., Steffes,M.W., Sutherland,D.E., Goetz,F.C. & Mauer,M. Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N. Engl. J. Med.* 339, 69-75 (1998).
61. Fleischer,N. et al. Functional analysis of a conditionally transformed pancreatic beta-cell line. *Diabetes* 47, 1419-1425 (1998).
62. Flotte,T. et al. Efficient ex vivo transduction of pancreatic islet cells with recombinant adeno-associated virus vectors. *Diabetes* 50, 515-520 (2001).
63. Gagliardino,J. *Fisiología humana de Houssay*. Cingolani,H. & Houssay,A. (eds.), pp. 571-592 (El Ateneo, Buenos Aires,2000).
64. Gainer,A.L., Korbitt,G.S., Rajotte,R.V., Warnock,G.L. & Elliott,J.F. Expression of CTLA4-Ig by biolistically transfected mouse islets promotes islet allograft survival. *Transplantation* 63, 1017-1021 (1997).
65. Gainer,A.L. et al. Improved survival of biolistically transfected mouse islet allografts expressing CTLA4-Ig or soluble Fas ligand. *Transplantation* 66, 194-199 (1998).
66. Gallichan,W.S., Kafri,T., Krahl,T., Verma,I.M. & Sarvetnick,N. Lentivirus-mediated transduction of islet grafts with interleukin 4 results in sustained gene expression and protection from insulinitis. *Hum. Gene Ther.* 9, 2717-2726 (1998).
67. Giannoukakis,N. et al. Infection of intact human islets by a lentiviral vector. *Gene Ther.* 6, 1545-1551 (1999).

68. Giannoukakis,N. et al. Adenoviral gene transfer of the interleukin-1 receptor antagonist protein to human islets prevents IL-1beta-induced beta-cell impairment and activation of islet cell apoptosis in vitro. *Diabetes* 48, 1730-1736 (1999).
69. Giannoukakis,N., Rudert,W.A., Robbins,P.D. & Trucco,M. Targeting autoimmune diabetes with gene therapy. *Diabetes* 48, 2107-2121 (1999).
70. Giannoukakis,N., Thomson,A. & Robbins,P. Gene therapy in transplantation. *Gene Ther.* 6, 1499-1511 (1999).
71. Gilmore,T.D. The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 18, 6842-6844 (1999).
72. Goodrum,F.D. & Ornelles,D.A. Roles for the E4 orf6, orf3, and E1B 55-kilodalton proteins in cell cycle-independent adenovirus replication. *J. Virol.* 73, 7474-7488 (1999).
73. Gores,G.J., Herman,B. & Lemasters,J.J. Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. *Hepatology* 11, 690-698 (1990).
74. Gorziglia,M.I. et al. Generation of an adenovirus vector lacking E1, e2a, E3, and all of E4 except open reading frame 3. *J. Virol.* 73, 6048-6055 (1999).
75. Graham,F.L., Smiley,J., Russell,W.C. & Nairn,R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-74 (1977).
76. Greig,N.H. et al. Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations. *Diabetologia* 42, 45-50 (1999).
77. Gurlo,T., Kawamura,K. & von Grafenstein,H. Role of inflammatory infiltrate in activation and effector function of cloned islet reactive nonobese diabetic CD8+ T cells: involvement of a nitric oxide-dependent pathway. *J. Immunol.* 163, 5770-5780 (1999).
78. Guz,Y., Nasir,I. & Teitelman,G. Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinology* 142, 4956-4968 (2001).

## Bibliografia introducció

79. Gysemans,C. et al. Prevention of primary non-function of islet xenografts in autoimmune diabetic NOD mice by anti-inflammatory agents. *Diabetologia* 46, 1115-1123 (2003).
80. Halbert,D.N., Cutt,J.R. & Shenk,T. Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J. Virol.* 56, 250-257 (1985).
81. Halvorsen,T.L., Beattie,G.M., Lopez,A.D., Hayek,A. & Levine,F. Accelerated telomere shortening and senescence in human pancreatic islet cells stimulated to divide in vitro. *J. Endocrinol.* 166, 103-109 (2000).
82. Halvorsen,T.L., Leibowitz,G. & Levine,F. Telomerase activity is sufficient to allow transformed cells to escape from crisis. *Mol. Cell Biol.* 19, 1864-1870 (1999).
83. Han,J. et al. The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev.* 10, 461-477 (1996).
84. Hardy,S., Kitamura,M., Harris-Stansil,T., Dai,Y. & Phipps,M.L. Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J. Virol.* 71, 1842-1849 (1997).
85. Hartigan-O'Connor,D., Barjot,C., Salvatori,G. & Chamberlain,J.S. Generation and growth of gutted adenoviral vectors. *Methods Enzymol.* 346, 224-246 (2002).
86. Hatfield,L. & Hearing,P. Redundant elements in the adenovirus type 5 inverted terminal repeat promote bidirectional transcription in vitro and are important for virus growth in vivo. *Virology* 184, 265-276 (1991).
87. Hay,J.G. et al. Targeting the replication of adenoviral gene therapy vectors to lung cancer cells: the importance of the adenoviral E1b-55kD gene. *Hum. Gene Ther.* 10, 579-590 (1999).
88. Hellerstrom,C. The life story of the pancreatic B cell. *Diabetologia* 26, 393-400 (1984).
89. Hellerstrom,C., Andersson,A., Swenne,I., Welsh,M. & Welsh,N. Efendic,S. & Grill,V. (eds.), pp. 79-91 (Raven Press, NY,1988).
90. Hellerstrom,C. & Swenne,I. *The Diabetic Pancreas.* Volk,B. & Arquilla,E. (eds.), pp. 53-79 (Plenum Press, NY,1985).



91. Hill,D.J., Petrik,J. & Arany,E. Growth factors and the regulation of fetal growth. *Diabetes Care* 21 Suppl 2, B60-B69 (1998).
92. Hofmann,C. et al. Ovine adenovirus vectors overcome preexisting humoral immunity against human adenoviruses in vivo. *J. Virol.* 73, 6930-6936 (1999).
93. Hoorens,A. & Pipeleers,D. Nicotinamide protects human beta cells against chemically-induced necrosis, but not against cytokine-induced apoptosis. *Diabetologia* 42, 55-59 (1999).
94. Hoorens,A., Stange,G., Pavlovic,D. & Pipeleers,D. Distinction between interleukin-1-induced necrosis and apoptosis of islet cells. *Diabetes* 50, 551-557 (2001).
95. Horridge,J.J. & Leppard,K.N. RNA-binding activity of the E1B 55-kilodalton protein from human adenovirus type 5. *J. Virol.* 72, 9374-9379 (1998).
96. Hughes,J.H., Colca,J.R., Easom,R.A., Turk,J. & McDaniel,M.L. Interleukin 1 inhibits insulin secretion from isolated rat pancreatic islets by a process that requires gene transcription and mRNA translation. *J. Clin. Invest* 86, 856-863 (1990).
97. Huotari,M.A., Palgi,J. & Otonkoski,T. Growth factor-mediated proliferation and differentiation of insulin-producing INS-1 and RINm5F cells: identification of betacellulin as a novel beta-cell mitogen. *Endocrinology* 139, 1494-1499 (1998).
98. Itoh,N. et al. Requirement of Fas for the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Exp. Med.* 186, 613-618 (1997).
99. Jahn,R. & Sudhof,T.C. Membrane fusion and exocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 863-911 (1999).
100. Jahr,H. et al. Isolated human pancreatic islets in vitro activate human complement. *Transplant. Proc.* 27, 3270 (1995).
101. Jahr,H., Pfeiffer,G., Hering,B.J., Federlin,K. & Bretzel,R.G. Endotoxin-mediated activation of cytokine production in human PBMCs by collagenase and Ficoll. *J. Mol. Med.* 77, 118-120 (1999).

## Bibliografia introducció

102. Ji,L., Bouvet,M., Price,R.E., Roth,J.A. & Fang,B. Reduced toxicity, attenuated immunogenicity and efficient mediation of human p53 gene expression in vivo by an adenovirus vector with deleted E1-E3 and inactivated E4 by GAL4-TATA promoter replacement. *Gene Ther.* 6, 393-402 (1999).
103. Ju,Q. et al. Transduction of non-dividing adult human pancreatic beta cells by an integrating lentiviral vector. *Diabetologia* 41, 736-739 (1998).
104. Kadowaki,T. Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models. *J. Clin. Invest* 106, 459-465 (2000).
105. Kaplan,J.M. et al. Novel role for E4 region genes in protection of adenovirus vectors from lysis by cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 73, 4489-4492 (1999).
106. Kapturczak,M. et al. Transduction of human and mouse pancreatic islet cells using a bicistronic recombinant adeno-associated viral vector. *Mol. Ther.* 5, 154-160 (2002).
107. Karlsen,A.E. et al. Cloning and expression of cytokine-inducible nitric oxide synthase cDNA from rat islets of Langerhans. *Diabetes* 44, 753-758 (1995).
108. Kawahara,D.J. & Kenney,J.S. Species differences in human and rat islet sensitivity to human cytokines. Monoclonal anti-interleukin-1 (IL-1) influences on direct and indirect IL-1-mediated islet effects. *Cytokine* 3, 117-124 (1991).
109. Kim,Y.H. et al. Apoptosis of pancreatic beta-cells detected in accelerated diabetes of NOD mice: no role of Fas-Fas ligand interaction in autoimmune diabetes. *Eur. J. Immunol.* 29, 455-465 (1999).
110. Kremer,E.J., Boutin,S., Chillon,M. & Danos,O. Canine adenovirus vectors: an alternative for adenovirus-mediated gene transfer. *J. Virol.* 74, 505-512 (2000).
111. Kubota,C. et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 990-995 (2000).

112. Kumar-Singh,R. & Chamberlain,J.S. Encapsidated adenovirus minichromosomes allow delivery and expression of a 14 kb dystrophin cDNA to muscle cells. *Hum. Mol. Genet.* 5, 913-921 (1996).
113. Kvist,S., Ostberg,L., Persson,H., Philipson,L. & Peterson,P.A. Molecular association between transplantation antigens and cell surface antigen in adenovirus-transformed cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 75, 5674-5678 (1978).
114. Lang,J. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *Eur. J. Biochem.* 259, 3-17 (1999).
115. Lee,V.M. & Stoffel,M. Bone marrow: an extra-pancreatic hideout for the elusive pancreatic stem cell? *J. Clin. Invest* 111, 799-801 (2003).
116. Lefebvre,V.H. et al. Culture of adult human islet preparations with hepatocyte growth factor and 804G matrix is mitogenic for duct cells but not for beta-cells. *Diabetes* 47, 134-137 (1998).
117. Leibowitz,G. et al. Gene transfer to human pancreatic endocrine cells using viral vectors. *Diabetes* 48, 745-753 (1999).
118. Leist,M. & Nicotera,P. The shape of cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 1-9 (1997).
119. Li,F.X. et al. The development of diabetes in E2f1/E2f2 mutant mice reveals important roles for bone marrow-derived cells in preventing islet cell loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 12935-12940 (2003).
120. Lieber,A., Steinwaerder,D.S., Carlson,C.A. & Kay,M.A. Integrating adenovirus-adeno-associated virus hybrid vectors devoid of all viral genes. *J. Virol.* 73, 9314-9324 (1999).
121. Lifson,N., Kramlinger,K.G., Mayrand,R.R. & Lender,E.J. Blood flow to the rabbit pancreas with special reference to the islets of Langerhans. *Gastroenterology* 79, 466-473 (1980).
122. Ling,Z. et al. Intercellular differences in interleukin 1beta-induced suppression of insulin synthesis and stimulation of noninsulin protein synthesis by rat pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 139, 1540-1545 (1998).
123. Ling,Z., In't Veld,P.A. & Pipeleers,D.G. Interaction of interleukin-1 with islet beta-cells. Distinction between indirect, aspecific cytotoxicity and direct, specific functional suppression. *Diabetes* 42, 56-65 (1993).

## Bibliografia introducció

124. Lipsett,M. & Finegood,D.T. beta-cell neogenesis during prolonged hyperglycemia in rats. *Diabetes* 51, 1834-1841 (2002).
125. Liu,D. et al. Cytokines induce apoptosis in beta-cells isolated from mice lacking the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS<sup>-/-</sup>). *Diabetes* 49, 1116-1122 (2000).
126. Liu,Y. et al. Expression of the bcl-2 gene from a defective HSV-1 amplicon vector protects pancreatic beta-cells from apoptosis. *Hum. Gene Ther.* 7, 1719-1726 (1996).
127. MacCuish,A.C., Irvine,W.J., Barnes,E.W. & Duncan,L.J. Antibodies to pancreatic islet cells in insulin-dependent diabetics with coexistent autoimmune disease. *Lancet* 2, 1529-1531 (1974).
128. Maedler,K. et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J. Clin. Invest* 110, 851-860 (2002).
129. Maier,J.A., Statuto,M. & Ragnotti,G. Endogenous interleukin 1 alpha must be transported to the nucleus to exert its activity in human endothelial cells. *Mol. Cell Biol.* 14, 1845-1851 (1994).
130. Mandrup-Poulsen,T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 39, 1005-1029 (1996).
131. Mandrup-Poulsen,T. et al. Affinity-purified human interleukin 1 is cytotoxic to isolated islets of Langerhans. *Diabetologia* 29, 63-67 (1986).
132. Mandrup-Poulsen,T., Bendtzen,K., Nielsen,J.H., Bendixen,G. & Nerup,J. Cytokines cause functional and structural damage to isolated islets of Langerhans. *Allergy* 40, 424-429 (1985).
133. Mandrup-Poulsen,T. et al. Ultrastructural studies of time-course and cellular specificity of interleukin-1 mediated islet cytotoxicity. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. [C.]* 95, 55-63 (1987).
134. Mannervik,M., Fan,S., Strom,A.C., Helin,K. & Akusjarvi,G. Adenovirus E4 open reading frame 4-induced dephosphorylation inhibits E1A activation of the E2 promoter and E2F-1-mediated transactivation independently of the retinoblastoma tumor suppressor protein. *Virology* 256, 313-321 (1999).

135. Mathis,D., Vence,L. & Benoist,C. beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature* 414, 792-798 (2001).
136. Matthews,D.A. & Russell,W.C. Adenovirus protein-protein interactions: molecular parameters governing the binding of protein VI to hexon and the activation of the adenovirus 23K protease. *J. Gen. Virol.* 76 ( Pt 8), 1959-1969 (1995).
137. McDaniel,M.L., Hughes,J.H., Wolf,B.A., Easom,R.A. & Turk,J.W. Descriptive and mechanistic considerations of interleukin 1 and insulin secretion. *Diabetes* 37, 1311-1315 (1988).
138. McMahon,G.A., Garfinkel,S., Prudovsky,I., Hu,X. & Maciag,T. Intracellular precursor interleukin (IL)-1alpha, but not mature IL-1alpha, is able to regulate human endothelial cell migration in vitro. *J. Biol. Chem.* 272, 28202-28205 (1997).
139. Melloul,D., Marshak,S. & Cerasi,E. Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45, 309-326 (2002).
140. Menger,M.D., Yamauchi,J. & Vollmar,B. Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. *World J. Surg.* 25, 509-515 (2001).
141. Mette,S.A., Pilewski,J., Buck,C.A. & Albelda,S.M. Distribution of integrin cell adhesion receptors on normal bronchial epithelial cells and lung cancer cells in vitro and in vivo. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 8, 562-572 (1993).
142. Mi,Z., Mai,J., Lu,X. & Robbins,P.D. Characterization of a class of cationic peptides able to facilitate efficient protein transduction in vitro and in vivo. *Mol. Ther.* 2, 339-347 (2000).
143. Michou,A.I., Lehrmann,H., Saltik,M. & Cotten,M. Mutational analysis of the avian adenovirus CELO, which provides a basis for gene delivery vectors. *J. Virol.* 73, 1399-1410 (1999).
144. Milo-Landesman,D. et al. Correction of hyperglycemia in diabetic mice transplanted with reversibly immortalized pancreatic beta cells controlled by the tet-on regulatory system. *Cell Transplant.* 10, 645-650 (2001).
145. Moller,D.E. Transgenic approaches to the pathogenesis of NIDDM. *Diabetes* 43, 1394-1401 (1994).

## Bibliografía introducció

146. Montana,E., Bonner-Weir,S. & Weir,G.C. Transplanted beta cell response to increased metabolic demand. Changes in beta cell replication and mass. *J. Clin. Invest* 93, 1577-1582 (1994).
147. Montanya,E. El trasplante de islotes de páncreas como terapia en la diabetes tipo 1. *Endocrinología y nutrición* 48, 1-2 (2001).
148. Montanya,E., Nacher,V., Biarnes,M. & Soler,J. Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* 49, 1341-1346 (2000).
149. Montolio M, Téllez,N., Soler J & Montanya E. Blood glucose modulates cytokine expression in the initial days after syngeneic islet transplantation. *Cell Transplant.* 2007.

Ref Type: In Press

150. Moriscot,C. et al. Contribution of adenoviral-mediated superoxide dismutase gene transfer to the reduction in nitric oxide-induced cytotoxicity on human islets and INS-1 insulin-secreting cells. *Diabetologia* 43, 625-631 (2000).
151. Morral,N. et al. Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 12816-12821 (1999).
152. Mosley,B. et al. The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *J. Biol. Chem.* 262, 2941-2944 (1987).
153. Muruve,D.A., Manfro,R.C., Strom,T.B. & Libermann,T.A. Ex vivo adenovirus-mediated gene delivery leads to long-term expression in pancreatic islet transplants. *Transplantation* 64, 542-546 (1997).
154. Navarro,X., Sutherland,D.E. & Kennedy,W.R. Long-term effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy. *Ann. Neurol.* 42, 727-736 (1997).
155. Ng,P. et al. A high-efficiency Cre/loxP-based system for construction of adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 10, 2667-2672 (1999).

156. Onengut-Gumuscu,S. & Concannon,P. The genetics of type 1 diabetes: Lessons learned and future challenges. *J. Autoimmun.* 25 Suppl, 34-39 (2005).
157. Orci,L. Macro- and micro-domains in the endocrine pancreas. *Diabetes* 31, 538-565 (1982).
158. Otonkoski,T. et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor has insulinotropic activity in human fetal pancreatic cells. *Diabetes* 43, 947-953 (1994).
159. Otonkoski,T. et al. A role for hepatocyte growth factor/scatter factor in fetal mesenchyme-induced pancreatic beta-cell growth. *Endocrinology* 137, 3131-3139 (1996).
160. Ozasa,T. et al. Cytokine gene expression in pancreatic islet grafts in the rat. *Transplantation* 64, 1152-1159 (1997).
161. Palmer,J.P. et al. Interaction of beta-cell activity and IL-1 concentration and exposure time in isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* 38, 1211-1216 (1989).
162. Parks,R.J., Bramson,J.L., Wan,Y., Addison,C.L. & Graham,F.L. Effects of stuffer DNA on transgene expression from helper-dependent adenovirus vectors. *J. Virol.* 73, 8027-8034 (1999).
163. Parks,R.J. et al. A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 13565-13570 (1996).
164. Parks,R.J. & Graham,F.L. A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging. *J. Virol.* 71, 3293-3298 (1997).
165. Parsons,J.A., Bartke,A. & Sorenson,R.L. Number and size of islets of Langerhans in pregnant, human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: effect of lactogenic hormones. *Endocrinology* 136, 2013-2021 (1995).
166. Parsons,J.A., Brelje,T.C. & Sorenson,R.L. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* 130, 1459-1466 (1992).

## Bibliografia introducció

167. Pavlovic,D., Chen,M.C., Gysemans,C.A., Mathieu,C. & Eizirik,D.L. The role of interferon regulatory factor-1 in cytokine-induced mRNA expression and cell death in murine pancreatic beta-cells. *Eur. Cytokine Netw.* 10, 403-412 (1999).
168. Prentki,M., Tornheim,K. & Corkey,B.E. Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. *Diabetologia* 40 Suppl 2, S32-S41 (1997).
169. Rabinovitch,A. et al. Transfection of human pancreatic islets with an anti-apoptotic gene (bcl-2) protects beta-cells from cytokine-induced destruction. *Diabetes* 48, 1223-1229 (1999).
170. Rabinovitch,A., Suarez-Pinzon,W.L., Shi,Y., Morgan,A.R. & Bleackley,R.C. DNA fragmentation is an early event in cytokine-induced islet beta-cell destruction. *Diabetologia* 37, 733-738 (1994).
171. Rahier,J., Goebbels,R.M. & Henquin,J.C. Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia* 24, 366-371 (1983).
172. Ramiya,V.K. et al. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat. Med.* 6, 278-282 (2000).
173. Reddy,P.S. et al. Replication-defective bovine adenovirus type 3 as an expression vector. *J. Virol.* 73, 9137-9144 (1999).
174. Reddy,S.A., Huang,J.H. & Liao,W.S. Phosphatidylinositol 3-kinase in interleukin 1 signaling. Physical interaction with the interleukin 1 receptor and requirement in NFkappaB and AP-1 activation. *J. Biol. Chem.* 272, 29167-29173 (1997).
175. Rehman,K.K. et al. Protection of islets by in situ peptide-mediated transduction of the Ikappa B kinase inhibitor Nemo-binding domain peptide. *J. Biol. Chem.* 278, 9862-9868 (2003).
176. Rekosh,D.M., Russell,W.C., Bellet,A.J. & Robinson,A.J. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell* 11, 283-295 (1977).
177. Rhodes,C.J. Introduction: the molecular cell biology of insulin production. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11, 223-225 (2000).
178. Ricordi,C. et al. Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. *Transplantation* 53, 407-414 (1992).



179. Ridgway,P.J., Hall,A.R., Myers,C.J. & Braithwaite,A.W. p53/E1b58kDa complex regulates adenovirus replication. *Virology* 237, 404-413 (1997).
180. Rorsman,P. The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* 40, 487-495 (1997).
181. Ryan,E.A. et al. Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes* 51, 2148-2157 (2002).
182. Ryan,E.A. et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54, 2060-2069 (2005).
183. Saldeen,J. et al. Efficient gene transfer to dispersed human pancreatic islet cells in vitro using adenovirus-polylysine/DNA complexes or polycationic liposomes. *Diabetes* 45, 1197-1203 (1996).
184. Sandberg,J.O., Andersson,A., Eizirik,D.L. & Sandler,S. Interleukin-1 receptor antagonist prevents low dose streptozotocin induced diabetes in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202, 543-548 (1994).
185. Sandberg,J.O., Eizirik,D.L. & Sandler,S. IL-1 receptor antagonist inhibits recurrence of disease after syngeneic pancreatic islet transplantation to spontaneously diabetic non-obese diabetic (NOD) mice. *Clin. Exp. Immunol.* 108, 314-317 (1997).
186. Sandler,S., Andersson,A. & Hellerstrom,C. Inhibitory effects of interleukin 1 on insulin secretion, insulin biosynthesis, and oxidative metabolism of isolated rat pancreatic islets. *Endocrinology* 121, 1424-1431 (1987).
187. Sandler,S., Bendtzen,K., Eizirik,D.L., Sjöholm,A. & Welsh,N. Decreased cell replication and polyamine content in insulin-producing cells after exposure to human interleukin 1 beta. *Immunol. Lett.* 22, 267-272 (1989).
188. Sandler,S. et al. Metabolism and beta-cell function of rat pancreatic islets exposed to human interleukin-1 beta in the presence of a high glucose concentration. *Immunol. Lett.* 26, 245-251 (1990).
189. Scaglia,L., Smith,F.E. & Bonner-Weir,S. Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology* 136, 5461-5468 (1995).

## Bibliografia introducció

190. Scarim,A.L., Heitmeier,M.R. & Corbett,J.A. Irreversible inhibition of metabolic function and islet destruction after a 36-hour exposure to interleukin-1 beta. *Endocrinology* 138, 5301-5307 (1997).
191. Scharp,D.W. et al. Intraportal islet allografts: the use of a stimulation index to represent functional results. *Transplant. Proc.* 23, 796-798 (1991).
192. Shapiro,A.M. et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.* 343, 230-238 (2000).
193. Sims,J.E. IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 117-122 (2002).
194. Sjöholm,A. Cytokines inhibit proliferation and insulin secretion by clonal rat insulinoma cells (RINm5F) non-synergistically and in a pertussis toxin-insensitive manner. *Immunol. Lett.* 30, 81-86 (1991).
195. Sjöholm,A. Differential effects of cytokines on long-term mitogenic and secretory responses of fetal rat pancreatic beta-cells. *Am. J. Physiol* 263, C114-C120 (1992).
196. Sjöholm,A. Role of polyamines in the regulation of proliferation and hormone production by insulin-secreting cells. *Am. J. Physiol* 264, C501-C518 (1993).
197. Sjöholm,A. & Hellerstrom,C. TGF-beta stimulates insulin secretion and blocks mitogenic response of pancreatic beta-cells to glucose. *Am. J. Physiol* 260, C1046-C1051 (1991).
198. Sjöholm,A., Welsh,N., Sandler,S. & Hellerstrom,C. Role of polyamines in mitogenic and secretory responses of pancreatic beta-cells to growth factors. *Am. J. Physiol* 259, C828-C833 (1990).
199. Soares,M.B. et al. RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon. *Mol. Cell Biol.* 5, 2090-2103 (1985).
200. Soria,B. et al. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 49, 157-162 (2000).

201. Southern,C., Schulster,D. & Green,I.C. Inhibition of insulin secretion by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha via an L-arginine-dependent nitric oxide generating mechanism. *FEBS Lett.* 276, 42-44 (1990).
202. Southern,C., Schulster,D. & Green,I.C. Inhibition of insulin secretion from rat islets of Langerhans by interleukin-6. An effect distinct from that of interleukin-1. *Biochem. J.* 272, 243-245 (1990).
203. Spranger,J. et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 52, 812-817 (2003).
204. Stassi,G. et al. Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Exp. Med.* 186, 1193-1200 (1997).
205. Stefan,Y. et al. Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes* 31, 694-700 (1982).
206. Steiner,D.F., Chan,S.J., Welsh,J.M. & Kwok,S.C. Structure and evolution of the insulin gene. *Annu. Rev. Genet.* 19, 463-484 (1985).
207. Steinwaerder,D.S., Carlson,C.A. & Lieber,A. Generation of adenovirus vectors devoid of all viral genes by recombination between inverted repeats. *J. Virol.* 73, 9303-9313 (1999).
208. Stevens,R.B. et al. Nitric oxide mediates early dysfunction of rat and mouse islets after transplantation. *Transplantation* 61, 1740-1749 (1996).
209. Stewart,P.L. et al. Cryo-EM visualization of an exposed RGD epitope on adenovirus that escapes antibody neutralization. *EMBO J.* 16, 1189-1198 (1997).
210. Stewart,P.L., Fuller,S.D. & Burnett,R.M. Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *EMBO J.* 12, 2589-2599 (1993).
211. Strandell,E., Buschard,K., Saldeen,J. & Welsh,N. Interleukin-1 beta induces the expression of hsp70, heme oxygenase and Mn-SOD in FACS-purified rat islet beta-cells, but not in alpha-cells. *Immunol. Lett.* 48, 145-148 (1995).

## Bibliografia introducció

212. Strandell,E., Eizirik,D.L., Korsgren,O. & Sandler,S. Functional characteristics of cultured mouse pancreatic islets following exposure to different streptozotocin concentrations. *Mol. Cell Endocrinol.* 59, 83-91 (1988).
213. Suarez-Pinzon,W.L., Yan,Y., Power,R., Brand,S.J. & Rabinovitch,A. Combination therapy with epidermal growth factor and gastrin increases beta-cell mass and reverses hyperglycemia in diabetic NOD mice. *Diabetes* 54, 2596-2601 (2005).
214. Svenson,M., Hansen,M.B., Heegaard,P., Abell,K. & Bendtzen,K. Specific binding of interleukin 1 (IL-1) beta and IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) to human serum. High-affinity binding of IL-1ra to soluble IL-1 receptor type I. *Cytokine* 5, 427-435 (1993).
215. Swenne,I. The role of glucose in the in vitro regulation of cell cycle kinetics and proliferation of fetal pancreatic B-cells. *Diabetes* 31, 754-760 (1982).
216. Swenne,I. The role of glucose in the in vitro regulation of cell cycle kinetics and proliferation of fetal pancreatic B-cells. *Diabetes* 31, 754-760 (1982).
217. Swenne,I. Effects of aging on the regenerative capacity of the pancreatic B-cell of the rat. *Diabetes* 32, 14-19 (1983).
218. Swenne,I., Hill,D.J., Strain,A.J. & Milner,R.D. Growth hormone regulation of somatomedin C/insulin-like growth factor I production and DNA replication in fetal rat islets in tissue culture. *Diabetes* 36, 288-294 (1987).
219. Tashiro,F., Niwa,H. & Miyazaki,J. Constructing adenoviral vectors by using the circular form of the adenoviral genome cloned in a cosmid and the Cre-loxP recombination system. *Hum. Gene Ther.* 10, 1845-1852 (1999).
220. Taylor,S.I., Accili,D. & Imai,Y. Insulin resistance or insulin deficiency. Which is the primary cause of NIDDM? *Diabetes* 43, 735-740 (1994).
221. Teuscher,A.U. et al. Successful islet autotransplantation in humans: functional insulin secretory reserve as an estimate of surviving islet cell mass. *Diabetes* 47, 324-330 (1998).
222. Thomson,J.A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147 (1998).

223. Tiedge,M., Lortz,S., Drinkgern,J. & Lenzen,S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46, 1733-1742 (1997).
224. Tisch,R. & McDevitt,H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85, 291-297 (1996).
225. Tollefson,A.E. et al. Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. *Nature* 392, 726-730 (1998).
226. Tollefson,A.E. et al. The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J. Virol.* 70, 2296-2306 (1996).
227. Vargas,F. et al. Endotoxin contamination may be responsible for the unexplained failure of human pancreatic islet transplantation. *Transplantation* 65, 722-727 (1998).
228. von Herrath,M.G., Efrat,S., Oldstone,M.B. & Horwitz,M.S. Expression of adenoviral E3 transgenes in beta cells prevents autoimmune diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 9808-9813 (1997).
229. Wahoff,D.C. et al. Autologous islet transplantation to prevent diabetes after pancreatic resection. *Ann. Surg.* 222, 562-575 (1995).
230. Wang,X. & Bergelson,J.M. Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection. *J. Virol.* 73, 2559-2562 (1999).
231. Warnock,G.L., Kneteman,N.M., Ryan,E.A., Rabinovitch,A. & Rajotte,R.V. Long-term follow-up after transplantation of insulin-producing pancreatic islets into patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 35, 89-95 (1992).
232. Weber,J. Genetic analysis of adenovirus type 2 III. Temperature sensitivity of processing viral proteins. *J. Virol.* 17, 462-471 (1976).
233. Weber,K.S., Draude,G., Erl,W., de Martin,R. & Weber,C. Monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow is inhibited by adenovirus-mediated gene transfer of I kappa B-alpha. *Blood* 93, 3685-3693 (1999).

## Bibliografia introducció

234. Weber,M. et al. Adenoviral transfection of isolated pancreatic islets: a study of programmed cell death (apoptosis) and islet function. *J. Surg. Res.* 69, 23-32 (1997).
235. Weber,T. et al. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759-772 (1998).
236. Webster,A., Russell,S., Talbot,P., Russell,W.C. & Kemp,G.D. Characterization of the adenovirus proteinase: substrate specificity. *J. Gen. Virol.* 70 ( Pt 12), 3225-3234 (1989).
237. Weiden,M.D. & Ginsberg,H.S. Deletion of the E4 region of the genome produces adenovirus DNA concatemers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 153-157 (1994).
238. Welsh,N. Interleukin-1 beta-induced ceramide and diacylglycerol generation may lead to activation of the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and the transcription factor ATF2 in the insulin-producing cell line RINm5F. *J. Biol. Chem.* 271, 8307-8312 (1996).
239. Welsh,N., Eizirik,D.L., Bendtzen,K. & Sandler,S. Interleukin-1 beta-induced nitric oxide production in isolated rat pancreatic islets requires gene transcription and may lead to inhibition of the Krebs cycle enzyme aconitase. *Endocrinology* 129, 3167-3173 (1991).
240. Welsh,N., Oberg,C., Hellerstrom,C. & Welsh,M. Liposome mediated in vitro transfection of pancreatic islet cells. *Biomed. Biochim. Acta* 49, 1157-1164 (1990).
241. Welsh,N. & Sandler,S. Interleukin-1 beta induces nitric oxide production and inhibits the activity of aconitase without decreasing glucose oxidation rates in isolated mouse pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 333-340 (1992).
242. Wessendorf,J.H., Garfinkel,S., Zhan,X., Brown,S. & Maciag,T. Identification of a nuclear localization sequence within the structure of the human interleukin-1 alpha precursor. *J. Biol. Chem.* 268, 22100-22104 (1993).
243. Westermark,P. & Wilander,E. The influence of amyloid deposits on the islet volume in maturity onset diabetes mellitus. *Diabetologia* 15, 417-421 (1978).
244. White,M.F. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 283, E413-E422 (2002).

245. White,S.A., Nicholson,M.L. & Hering,B.J. Can islet cell transplantation treat diabetes? *BMJ* 321, 651-652 (2000).
246. Wollheim,C., Lang,J. & Regazzi,R. The exocytotic process of insulin secretion and its regulation by Ca<sup>2+</sup> and G proteins. *Diabetes reviews* 4, 276-294 (1996).
247. Woodbury,D., Schwarz,E.J., Prockop,D.J. & Black,I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* 61, 364-370 (2000).
248. Xu,G., Stoffers,D.A., Habener,J.F. & Bonner-Weir,S. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes* 48, 2270-2276 (1999).
249. Yamada,K. et al. Mouse islet cell lysis mediated by interleukin-1-induced Fas. *Diabetologia* 39, 1306-1312 (1996).
250. Yang,Y.W. & Kotin,R.M. Glucose-responsive gene delivery in pancreatic Islet cells via recombinant adeno-associated viral vectors. *Pharm. Res.* 17, 1056-1061 (2000).
251. Zakhartchouk,A.N. et al. Construction and characterization of E3-deleted bovine adenovirus type 3 expressing full-length and truncated form of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gD. *Virology* 250, 220-229 (1998).
252. Zumsteg,U., Frigerio,S. & Hollander,G.A. Nitric oxide production and Fas surface expression mediate two independent pathways of cytokine-induced murine beta-cell damage. *Diabetes* 49, 39-47 (2000).





**Hipòtesi i objectius**



La citocina proinflamatòria IL-1 $\beta$  té diversos efectes deleteris sobre les cèl·lules beta pancreàtiques. Aquesta citocina participa en el procés inflamatori que té lloc durant el desenvolupament de la diabetis mellitus tipus 1, quan es dona una destrucció massiva de les cèl·lules beta dels illots pancreàtics. Per altra banda, la seva expressió en els empelts d'illots suggereix que podria estar implicada en la pèrdua de massa beta (més del 50%) que té lloc durant els primers dies després del trasplantament.

La família d'IL-1 està formada per membres pro- i anti-inflamatoris. Entre els membres proinflamatoris es troben els lligands IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , i el complex del receptor tipus 1; i entre els anti-inflamatoris cal anomenar el receptor tipus 2 (scavenger) i l'Antagonista del Receptor tipus 1 (IL-1Ra), que s'uneix al receptor tipus 1 sense iniciar la senyalització intracel·lular. Les propietats antiinflamatòries d'IL-1Ra el fan particularment interessant en el disseny d'estratègies terapèutiques dirigides al bloqueig de l'acció d'IL-1.

La hipòtesi en la que s'ha basat aquest treball és que la citocina proinflamatòria, IL-1, està implicada en la fallada del trasplantament. Designant la sobreexpressió d'IL-1Ra com l'estratègia a seguir per millorar el pronòstic del trasplantament singènic d'illots pancreàtics.

Per tant, l'objectiu general de l'estudi és determinar si la sobreexpressió d'IL-1Ra en els illots pancreàtics protegeix les cèl·lules beta dels efectes deleteris d'IL-1 sobre els illots en cultiu i millora el pronòstic del trasplantament.

Els objectius concrets d'aquest estudi van ser:

1. Estudiar els efectes d'IL-1 $\beta$  i la sobreexpressió d'IL-1Ra sobre la viabilitat i proliferació de les cèl·lules beta dels illots de rata en cultiu.

## Hipòtesi i Objectius

2. Estudiar els efectes de la sobreexpressió d'IL-1Ra sobre la viabilitat, proliferació i massa de les cèl·lules beta dels illots trasplantats i determinar si el bloqueig de l'acció de la IL-1 millora el pronòstic del trasplantament d'illots pancreàtics.

## **Material i Mètodes**



## 1.- Disseny experimental

Els estudis dels efectes d'IL-1 $\beta$  i de la sobreexpressió de l'antagonista del receptor d'IL-1 (IL-1Ra) sobre la viabilitat i proliferació dels illots de Langerhans es van fer amb un cultiu primari d'illots de rates Lewis. Aquest model ens va permetre estudiar els efectes d'aquestes dues proteïnes i la seva interacció. A més ens va permetre ajustar les dosis d'adenovirus òptimes per transduir eficientment els illots de rata sense afectar-ne la funció, viabilitat i capacitat proliferativa de les cèl·lules beta pancreàtiques.

Els estudis amb illots trasplantats es van fer utilitzant un model de trasplantament d'illots singènics a animals que s'havien fet hiperglucèmics mitjançant l'administració d'una dosi única d'estreptozotocina. Aquest model és molt útil per estudiar els processos inflamatoris derivats del procés del trasplantament *per se*, i que per tant seran comuns pel trasplantament d'illots o cèl·lules productores d'insulina al·logènics, i xenogènics. L'utilització d'animals hiperglucèmics ens permet estudiar l'efecte de les concentracions elevades de glucosa en sang sobre els illots, i la seva possible relació amb la citocina proinflamatòria IL-1.

Per als estudis d'apoptosi, proliferació, àrea beta i massa beta es van trasplantar 500 illots, que és una massa insular clarament insuficient per restablir la normoglucèmia<sup>1</sup>, amb l'objectiu de mantenir els animals hiperglucèmics fins al final de l'estudi, assegurant que els illots trasplantats estaven sotmesos a les mateixes condicions d'hiperglucèmia tant en el grup control com en l'infectat.

Per comprovar si els efectes beneficiosos de la sobreexpressió d'IL-1Ra sobre la massa beta es traduïen en una reducció del nombre d'illots necessaris per restablir la normoglucèmia, es van trasplantar 800 illots que són una massa insular subcrítica per a aconseguir l'euglucèmia del receptor,

a animals que s'havien fet diabètics per una única injecció d'estreptozotocina.

## **2.- Animals d'experimentació**

Es van utilitzar rates mascle LEW/SsNHsd (Harlan, Horst, Països Baixos) d'entre 6-9 setmanes d'edat com a donants d'illots i com a receptors del trasplantament. Es tracta d'un model animal singènic que permet realitzar estudis d'inflamació no induïda pel rebuig.

## **3.- Aïllament d'illots pancreàtics**

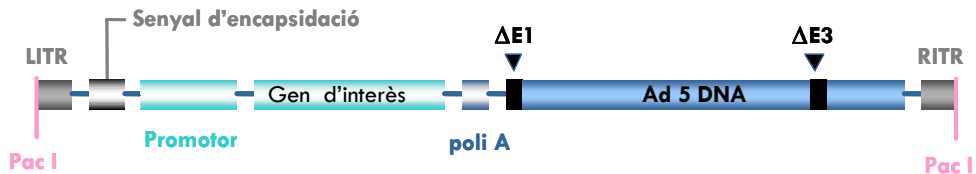
L'aïllament i purificació dels illots es va fer per digestió del pàncrees amb col·lagenasa P (Col·lagenasa P, Boehringer Mannheim Biochemicals, Mannheim, Alemanya). Per tot l'estudi es va utilitzar el mateix lot de col·lagenasa per evitar possibles variacions en l'activitat endotoxina present en la barreja d'enzims. Amb l'animal anestesià amb Pentobarbital sòdic (Abbott Laboratories, Madrid) (25 mg / Kg) per injecció intraperitoneal, es va fer una exposició del pàncrees per laparotomia mitja. Es va lligar el colèdoc pancreàtic a nivell de l'ampolla de Vater i es va canular distalment amb un tub de plàstic flexible injectant 7 ml de la solució de col·lagenasa i medi de cultiu M-199 (2 mg/ml). L'animal va ser sacrificat i el pàncrees dissecionat de la resta de teixits i incubat a 37°C durant 23 minuts per tal de que es digerís enzimàticament. La digestió s'aturà per addició de medi M-199 fred i es van fer tres rentats del digerit abans de passar-lo per un filtre amb un porus de 400 µm. Un cop eliminades les restes de teixit no digerit, els illots van ser separats de la resta del filtrat mitjançant un gradient de densitat que es va fer amb Histopaque 1077 (Sigma) i centrifugant a 2300 rpm durant 15 min. a 4°C. Després del gradient es va recuperar la interfase, que és on quedaren els illots, i se'n van fer 3 rentats abans de passar-los a plaques de Petri. Un cop a les plaques, els illots van ser recuperats amb una pipeta automàtica sota un estereomicroscopi



seleccionant-los per la mida (diàmetre igual o inferior a 200  $\mu\text{m}$ ) per tal d'homogeneïtzar la població d'illots.

#### 4.- Preparació dels adenovirus recombinants

Per tal d'introduir el gen exogen a les cèl·lules dels illots es van fer servir com a vectors els adenovirus 5 recombinants als quals els mancaven les regions 1 i 3 (Ad5- $\Delta 1\Delta 3$ ). Com a controls de la infecció es van emprar adenovirus que codifiquen pel gen de la proteïna verda fluorescent (Ad-GFP) o bé pel gen de la  $\beta$ -galactosidasa (Ad-LacZ) cedits per la Dra. Gómez-Foix (Universitat de Barcelona). L'adenovirus que codifica pel gen de l'antagonista del receptor de la interleucina-1 (Ad-IL-1Ra) va ser cedit pel Dr. Robbins (Universitat de Pittsburg). En tots els casos els adenovirus portaren com a director de l'expressió gènica el promotor de citomegalovirus.



**Fig. 1. Esquema dels adenovirus recombinants utilitzats en aquest estudi.** LITR, Repetició Terminal Invertida Esquerra; RITR, Repetició Terminal Invertida Dreta; Pac I, diana de restricció

Quan es va voler obtenir més quantitat de virus aquests es van fer replicar en la línia cel·lular 293 (ATCC, Manassas, VA, Estats Units). Aquesta és una línia cel·lular obtinguda a partir de cèl·lules de ronyó d'embrions humans i transformada amb el DNA de l'adenovirus 5. Aquestes cèl·lules són particularment sensibles a la infecció d'adenovirus 5 i són extensament utilitzades per replicar i titular adenovirus 5 recombinants que els manca alguna regió del seu DNA, ja que expressen les proteïnes necessàries per la correcta replicació i encapsidació dels virions.

Aquestes cèl·lules es van cultivar amb medi de cultiu EMEM (ATCC, Manassas, Va, Estats Units) amb un 10% de sèrum de cavall (Biological industries, Israel). Quan es va voler amplificar els virus, es va descongelar una al·líquota de les cèl·lules 293 que es van deixar cultivant tota la nit. Quan les cèl·lules van arribar a un 50-60% de confluència s'infectaren amb els virus en un volum mínim de medi de cultiu sense sèrum. El procés de la infecció es va dur a terme a 37°C i un 5% de CO<sub>2</sub> durant dues hores. Finalment es va afegir medi fresc amb sèrum i es van cultivar les cèl·lules fins que l'efecte citopàtic va ser aparent. En el cas dels virus que codificaven pel gen de la proteïna verda, la replicació dels adenovirus va ser monitoritzada mitjançant el microscopi invertit de fluorescència.

Després de 4-5 dies de la infecció les cèl·lules patiren un canvi de morfologia important conegut com a efecte citopàtic, en aquest moment es va fer l'extracció dels adenovirus mitjançant cicles de congelació-descongelació i es van purificar utilitzant un equipament comercial (BD Adeno-X™ Virus Purification Kit, BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, Estats Units). La purificació es va fer per poder tenir els adenovirus lliures de restes cel·lulars. Aquesta es basa en una primera filtració del sobrenadant i homogenat de les cèl·lules 293 per tal d'eliminar restes cel·lulars i un segon filtratge de la solució mitjançant una membrana on hi queden retinguts els adenovirus. Això permet que se'ls puguin fer rentats i finalment s'elueixen amb 2-5 ml de tampó d'elució que conté els virus.

Quan va ser necessària es va dur a terme una segona infecció per tal d'aconseguir una major quantitat d'adenovirus recombinant.

Un cop obtinguts els adenovirus aquests es van titular utilitzant un equipament comercial (Adeno-X™ Rapid Titer Kit, BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, Estats Units). Aquesta titulació es va fer per

immunocitoquímica de les cèl·lules 293 que havien estat infectades amb diferents dilucions del filtrat obtingut anteriorment.

## **5.- Infecció dels illots amb adenovirus**

Un cop obtinguda una població pura d'illots, aquests es van separar en grups de 200 i es van infectar amb els adenovirus pertinents (Ad-GFP, Ad-LacZ o Ad-IL-1Ra) durant 2h a 37°C i un 5% de CO<sub>2</sub>, en un volum mínim de medi de cultiu RPMI 1640 (Sigma) sense sèrum; també es van afegir grups de 200 illots que es van exposar a les mateixes condicions, però sense els adenovirus. Després de la infecció els illots es van cultivar durant 18h amb medi RPMI 1640 + 10% de sèrum de vedella fetal (FCS) i 11.1 mM de glucosa per tal de deixar-los recuperar.

Per establir les unitats formadores de calves (pfu) d'adenovirus necessàries per infectar els illots i aconseguir una bona eficiència d'infecció, es van utilitzar diferents concentracions d'adenovirus. En tots els casos el volum final d'infecció va ser de 400 µl, i les pfu van ser de  $8 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^6$  i  $6.25 \times 10^6$ .

## **6.- Cultiu dels illots**

Es van utilitzar diferents condicions de cultiu segons l'experiment a realitzar.

### **6.1.- Eficiència de la infecció i viabilitat cel·lular dels illots**

Després de la infecció els illots es van cultivar durant 48h amb RPMI 1640+ 10% FCS i 11.1 mM de glucosa a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Finalment es va determinar la eficiència de la infecció i la viabilitat cel·lular per microscòpia i per citometria de flux.

## **6.2.- Efecte d' IL-1 $\beta$ i de la sobreexpressió d'IL-1Ra sobre els illots**

Després de la infecció els illots es van cultivar durant tota la nit amb medi RPMI 1640+10% FCS i 11.1 mM de glucosa a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> per tal de deixar-los recuperar. Llavors els illots es van cultivar amb el mateix medi que contenia 5.5 o 22.2 mM de glucosa i en presència o absència de 50 U/ml de IL-1 $\beta$  (BD Pharmingen, Heidelberg, Alemanya) durant 48h.

## **7.- Inducció de la diabetis**

Els receptors del trasplantament d'illots es van fer diabètics per una única injecció intraperitoneal d'estreptozotocina (STZ) (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO, Estats Units) de 65 mg/kg dissolta en tampó citrat (pH 4.5). Els animals es van considerar diabètics quan presentaren hiperglucèmia, poliúria i limitació en el guany de pes. Únicament s'acceptaren com a receptors diabètics addients pel trasplantament els animals que presentaren abans del trasplantament dues glucèmies consecutives superiors a 20 mmol/l. Per tal d'evitar la regeneració del pàncrees endogen després del trasplantament, els animals no van ser trasplantats fins 14 - 18 dies després de la injecció amb STZ.

## **8.- Mesura de la glucèmia i del pes**

El seguiment de la glucèmia i del pes dels animals que anaven a ser trasplantats es va fer el dia de la injecció amb STZ, després de 3 i 7 dies i el dia del trasplantament. La glucèmia es determinà entre les 9h i les 11h del matí i els animals havien tingut lliure accés al menjar i a l'aigua durant tota la nit. La sang s'obtingué de la cua i es recollí directament amb una tira reactiva de glucosa (Glucocard Memory Strips, Menarini Diagnostics, USA) que va ser llegida mitjançant un glucòmetre portàtil (Glucocard, Menarini).

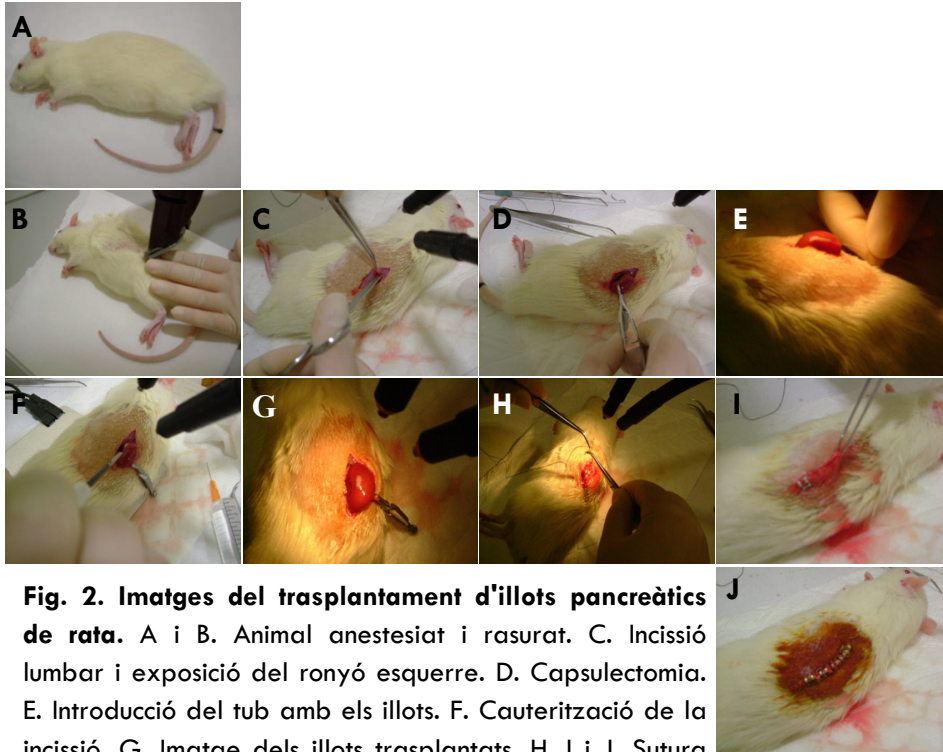
## 9.- Trasplantament d'illots pancreàtics

Després de la infecció, els illots es van deixar recuperar durant tota la nit com s'ha explicat anteriorment. Al dia següent se'ls va canviar el medi i van ser comptats i recollits en grups de 500 o 800 segons el grup experimental, es van deixar sedimentar i es van passar a un tub de polietilè (PE-50, Smiths Industries, Regne Unit) amb l'ajuda d'una xeringa Hamilton d'1 ml (Hamilton Company, Estats Units). El tub es va centrifugar a 600 rpm durant 1 min. per agrupar els illots prèviament al trasplantament.

Els animals van ser anestesiats amb Ketamina (5 mg/100g), Diazepam (0.32 mg/100 g), Atropina (0.025 mg/100 g) via intraperitoneal.

### 9.1.- Procediment del trasplantament

Un cop anestesiats i rasurats els animals (Fig. 1A i 1B), se'ls va practicar una incisió lumbar (Fig. 1C) i es va exposar el ronyó esquerre. Es va fer una petita capsulectomia en el pol inferior del ronyó per poder introduir el tub amb els illots (Fig. 1D). Amb l'ajuda d'una xeringa Hamilton es van injectar els illots en el pol superior del ronyó (Fig. 1E). La capsulectomia es va tancar amb un cauteritzador de baixa temperatura (AB Medica S.A., Barcelona) (Fig. 1F) i es va suturar la incisió lumbar (Fig. 1H; I i J).



**Fig. 2. Imatges del trasplantament d'illots pancreàtics de rata.** A i B. Animal anestesià i rasurat. C. Incissió lumbar i exposició del ronyó esquerre. D. Capsulectomia. E. Introducció del tub amb els illots. F. Cauterització de la incissió. G. Imatge dels illots trasplantats. H, I i J. Sutura de la ferida.

#### 10.- Recuperació dels empelts d'illots

L'extracció dels empelts d'illots es va fer als 3, 10 i 28 dies després del trasplantament. Per a cada grup el nombre d'animals va ser de 6.

Un cop anestesià l'animal, com s'ha explicat anteriorment, es va exposar el ronyó que contenia els illots i sota l'estereomicroscopi se'n va retallar la zona de la càpsula que cobria els illots, el que permeté retirar la totalitat dels illots trasplantats. Un cop acabada l'extracció de l'empelt es va examinar el córtex renal amb l'ajuda de l'estereomicroscopi per tal de comprovar que no quedaven restes de teixit insular. Finalment es va fer una nefrectomia d'aquest ronyó i es va suturar la incissió. Inmediatament després de l'extracció, els empelts van ser submergits en PFA al 4%.

## 11.- Citometria de flux

Es va emprar aquesta tècnica per determinar l'eficiència de la infecció, la viabilitat i la mort cel·lular de les cèl·lules de l'illot.

### 11.1.- El citòmetre

El citòmetre de flux utilitzat (FACScalibur, Beckton Dickinson Instrument, Heidelberg, Alemanya) consta d'un làser d'argó que excita les partícules a una longitud d'ona de 488 nm i d'un làser diode que les excita a 633 nm. Per captar la llum emesa per les partícules excitades pel làser d'argó hi ha tres fotomultiplicadors (FL) que capten la llum emesa a  $530 \pm 15$  nm (FL1),  $585 \pm 21$  nm (FL-2) i  $> 670$  nm (FL3). La detecció de la llum emesa per les partícules excitades pel làser diode es captada pel fotomultiplicador 4 (FL4) a  $661 \pm 8$  nm.

El sistema va connectat a un software (CELLQuest, Beckton Dickinson) des d'on es pot manipular l'amperatge dels fotomultiplicadors i compensar els diferents fotomultiplicadors per poder ajustar la detecció del senyal emés per la mostra. Les compensacions es van dur a terme quan es van utilitzar dos fluorocroms diferents.

### 11.2.- Preparació de la mostra

Després del cultiu, els illots es van rentar amb tampó fosfat (PBS) i es van repartir en gups de 100 illots en tubs de citometria que contenen 1 ml de Tripsina-EDTA (0.5g tripsina i 0.2 g EDTA·4Na / L) (Sigma) i 10 unitats de DNasa 1 (Promega, Madison, WI, Estats Units). La dispersió dels illots es va fer mecànicament amb una pipeta automàtica i per digestió enzimàtica a 37°C durant 6 min. Un cop finalitzada la digestió aquesta es va aturar per l'addició de medi de cultiu M-199 + 10% FBS i es van fer 2 rentats de les cèl·lules per tal d'eliminar possibles restes de tripsina.

En aquest punt es va determinar el nombre de cèl·lules obtingudes i la seva viabilitat per incorporació de blau de tripà (Sigma). La barreja de cèl·lules i blau de tripà (proporció 1/2) es va introduir en una cambra de Neubauer i van ser visualitzades en un microscopi invertit.

### **11.3.- Eficiència de la infecció per adenovirus**

Per determinar l'eficiència de la infecció dels illots pancreàtics es va utilitzar Ad-GFP com a vector d'expressió.

Després de 48h de cultiu els illots infectats i els seus corresponents controls negatius van ser dispersats i van ser analitzats en el citòmetre de flux. Les cèl·lules van ser excitades pel làser d'argó a 488 nm i es va detectar la fluorescència verda mitjançant el FL1 a  $530 \pm 15$  nm.

### **11.4.- Viabilitat cel·lular**

Per determinar la viabilitat de les cèl·lules infectades es va utilitzar Ad-LacZ com a vector d'expressió, ja que el marcador de viabilitat utilitzat presentava el mateix espectre d'emissió que la proteïna verda fluorescent. Per separar les cèl·lules vives de les mortes es va utilitzar el di-O-acetat de fluoresceïna (FDA). Les cèl·lules viables tenen la capacitat d'incorporar aquest compost, que és apolar i no fluorescent, i ràpidament hidrolitzar-lo mitjançant les acetil esterases convertint-lo en un compost polar i fluorescent que és retingut a l'interior de les cèl·lules. Les cèl·lules que no són viables no gaudeixen de l'activitat esterasa i per tant no podran hidrolitzar el FDA i no quedaran marcades.

Després de la dispersió, les cèl·lules dels illots es van incubar durant 10 min a 37°C amb FDA (4 µg/µl) i es van analitzar en el citòmetre utilitzant el fotomultiplicador 1 ( $530 \pm 15$  nm).



### 11.5.- Apoptosi i Necrosi

Per poder separar les cèl·lules apoptòtiques de les necròtiques vam marcar les cèl·lules amb anexina V marcada amb fluoresceïna i iodur de propidi.

Quan una cèl·lula rep un estímul apoptòtic i entra en apoptosi un dels primers canvis estructurals que pateix és l'exposició de la fosfatidilserina a la cara extracel·lular de la membrana plasmàtica. L'anexina V és una proteïna amb activitat anti-fosfolipasa que s'uneix a la fosfatidilserina que queda exposada en la part externa de la membrana citoplasmàtica de les cèl·lules apoptòtiques.

Cal dir que les cèl·lules que comencen a entrar en apoptosi (apoptòtiques primerenques) experimenten aquests petits canvis estructurals, però encara mantenen la integritat de la membrana citoplasmàtica. Aquesta característica la perden totalment les cèl·lules necròtiques i les que ja es troben en una fase avançada de l'apoptosi (apoptòtiques tardanes), així doncs, per tal de separar les cèl·lules apoptòtiques primerenques de les tardanes i necròtiques vam fer un doble marcatge amb iodur de propidi. Aquesta és una molècula no permeable i fluorescent que s'uneix als àcids nucleics sense o amb molt poca preferència per una seqüència determinada. Aquesta unió es dona estequiomètricament (1 molècula cada 4-5 parells de bases d'àcid nucleic). Com que es tracta d'una molècula no permeable, només podrà marcar els àcids nucleics de les cèl·lules que han perdut la integritat de les membranes citoplasmàtica i nuclear (apoptosi tardana i necrosi).

Els illots que havien estat cultivats a 22.2 mM de glucosa en presència o absència de 50 U/ml d'IL-1 $\beta$  durant 48h van ser dispersats.

Posteriorment es van fer dos rentats de les cèl·lules amb tampó d'unió (10 mM Hepes pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) i es van incubar amb 2 µg/ml d'anexina V-FITC (Annexin V-FITC kit, Bender Medsystems, Vienna, Austria) durant 30 min. a temperatura ambient. Finalment i just abans d'analitzar les mostres en el citòmetre de flux es van afegir 0.05 µg/ml de iodur de propidi (Sigma). Es van utilitzar els fotomultiplicadors 1 i 3 del citòmetre per detectar la llum emesa pels fluorocroms.

En totes les determinacions que es van fer en el citòmetre de flux es van contar un mínim de 10000 events.

## 12.- Western Blot

Per comprobar l'expressió de la proteïna exògena, IL-1Ra, es va fer un "western blot" d'homogenats d'illots.

Després de la infecció, els illots van ser cultivats durant 48h amb medi RPMI 1640 + 10% FCS i 11.1 mM de glucosa. Un cop finalitzat el cultiu, es van fer tres rentats dels illots amb PBS per passar-los després a una solució de lisi (PBS, 1% tritó (Triton x-100, Sigma), que contenia una barreja d'inhibidors de les proteases (AEBSF 2 mM, EDTA 1 mM, Bestatina 130 µM, E-64 14 µM, Leupeptina 1 mM, Aprotinina 0.3 µM) (Sigma). Es van fer 10 aspiracions de la barreja amb una xeringa d'insulina per tal d'afavorir el trencament de les membranes cel·lulars i l'alliberament del contingut proteic. Finalment, es va centrifugar l'homogenat a 10000 rpm durant 10 min. per tal de descartar les restes cel·lulars i del sobrenedant se'n va determinar la concentració de proteïnes totals pel mètode colorimètric de l'àcid bicinoníic mitjançant un equipament comercial (BCA Protein Assay Reagent Kit, PIERCE, Rockford, IL, Estats Units).

Les mostres de proteïna es van analitzar per electroforesi en un gel de poliacrilamida que contenia SDS com a agent desnaturalitzant. Els gels

es van preparar segons el sistema de Laemmli. El gel concentrador (0.125 M Tris -HCl, pH 6.8; 0.1% SDS; 4% acrilamida/bis; 0.05% APS, 0.05 TEMED) i el gel separador (0.375 M Tris-HCl, pH 8.8; 0.1% SDS; 10% acrilamida/bis; 0.05% APS; 0.05% TEMED) es van deixar polimeritzar mentre es preparava la mostra.

Es van carregar 4 µg de proteïna de cada mostra que es van barrejar amb el tampó de càrrega (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 25% glicerol, 2% SDS, 0.01% blau de bromofenol) i es van incubar durant 5 min. a 95 °C just abans de ser carregades al gel. Com a marcadors de pes molecular es van utilitzar el "Prestained SDS-PAGE Standard, Broad Range" (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Estats Units), i el "Full Range Rainbow" (Amersham Biosciences UK Limited, Little Chalfont Buckinghamshire, Regne Unit).

L'electroforesi es va realitzar en una cubeta MiniProtean II (Bio-Rad). El tampó d'electroforesi es va preparar a partir d'una solució concentrada 10X comercial (Bio-Rad), la concentració final dels components fou 25 mM Tris, 192 mM de glicina i 0.1% de SDS amb un pH 8.3. La separació de les proteïnes es va dur a terme a 150 V i 0.04 A (0.02 A per gel) durant 60 min.

Un cop finalitzada l'electroforesi, es va deixar estabilitzar el gel separador amb el tampó de transferència de Towbin (25 mM Tris-base, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8.3) durant uns 10-15 minuts. La membrana de nitrocelulosa (Sigma) i els papers secants (QUICK-DRAW<sup>®</sup> extra thick blotting paper, Sigma) es van estabilitzar durant 15-30 min.

La transferència de les proteïnes del gel a la membrana de nitrocelulosa es va realitzar en un aparell de transferència del tipus semi-sec (Trans-Blot SD semy-dry transfer cell, Bio-Rad) durant 30 minuts a 15 V. Un

cop finalitzada la transferència es va comprobar la seva eficiència tenyint la membrana amb Ponceau (Sigma) durant 5 min. i el gel amb blau de Coomassie (Sigma) durant 10 min., tots dos a temperatura ambient. Al finalitzar les respectives incubacions el gel i la membrana es van destenyir amb aigua bidestilada.

Un cop comprovada l'eficiència de la transferència es va continuar el protocol de marcatge de la membrana. Després de 3 rentats amb TBST es van bloquejar les unions inespecífiques de la membrana amb TBSTA (TBST , 3% BSA) a 4°C durant tota la nit. La membrana es va rentar amb TBST i es va incubar amb l'anticòs anti-IL-1Ra humà (R&D systems, Abingdon, Regne Unit) procedent de cabra (dilució final 1: 500) durant 1 h a temperatura ambient. Després de 3 rentats amb TBSTA la membrana es va incubar amb l'anticòs secundari que reconeixia les immunoglobulines de cabra (DAKO, Carpinteria, CA, Estats Units) marcat amb peroxidasa (dilució final 1: 1500) durant 1h a temperatura ambient. Finalment es van fer 3 rentats de la membrana amb TBST i es va revelar amb un substrat de la peroxidasa que dóna un producte luminescent (ECL Western blotting detection reagents and analysis system, Amersham) durant 1 min. La membrana es va exposar a una pel·lícula autoradiogràfica (Amersham) durant 10 min. i es va revelar per procediments habituals per tal de visualitzar les bandes.

Per comprobar la quantitat de proteïna carregada, les membranes es van rentar amb una solució que eliminava el marcatge anterior (Restore™ Western Blot Stripping Buffer, Pierce) i es van tornar a marcar amb l'anticòs anti-tubulina de ratolí (Sigma) (dilució final 1: 2000) seguint el mateix protocol que per al marcatge del IL-1Ra i com a anticòs secundari es va utilitzar un anti-immunoglobulines de ratolí (Sigma) (dilució final 1:3000). El procediment de revelat de la membrana va ser igual que l'anterior, però

l'exposició a la pel·lícula autoradiogràfica va ser molt més curta, de 5 segons.

La quantificació de l'expressió de la proteïna IL-1Ra es va fer per densitometria, utilitzant el programa Phoretix 1D (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK).

### **13.- Immunohistoquímica**

En el cas dels experiments *in vitro*, els illots cultivats es van rentar amb PBS i se'n va fer un pellet que es fixà amb PFA al 4% a 4°C durant tota la nit.

En els experiments *in vivo*, els empelts d'illots recuperats es van fixar directament amb PFA al 4% a 4°C durant tota la nit. Després de la fixació es va retirar l'excés de fixador per capilaritat i es va pesar l'empelt en una balança analítica que pesava fins a 0.01 mg (Mettler Instruments Corporation, Estats Units). Aquest procediment també es va dur a terme amb els pellets de 500 illots utilitzats per quantificar la massa beta inicialment trasplantada.

En tots els casos les peces es van rentar amb tampó fosfat per retirar les restes del fixador i es van incloure en parafina. Dels blocs se'n van fer seccions de 3 µm per tal de fer les diferents tincions.

#### **13.1.- Determinació de l'eficiència de la infecció de les cèl·lules beta de l'illot**

Per determinar la quantitat de cèl·lules beta que expressaven la proteïna exògena es van utilitzar seccions d'illots que havien estat infectats amb Ad-GFP i cultivats durant 48h. Les preparacions es van incubar amb un anticòs de conill d'índies anti-insulina de porc (Dako) (dilució final 1:500) a 4°C durant tota la nit havent bloquejat prèviament les unions inespecífiques

amb sèrum de xai al 5%. Després dels rentats amb PBS i 5% de sèrum de xai, les seccions es van incubar durant 30 min. amb un anticòs secundari marcat amb rodamina (cedit per la Dra. Marta Vives, Universitat Autònoma de Barcelona) (dilució final 1:100).

Un cop les peces muntades amb medi de muntatge per a fluorescència (Fluoroprep, Dako) les preparacions es van visualitzar sota llum de fluorescència utilitzant un filtre de rodamina i un de fluoresceïna en un microscopi Olympus H2. Es van captar les imatges corresponents a tots els camps i mitjançant un programa d'anàlisi d'imatge (Adobe Photoshop 6.0, Adobe Systems Co, Estats Units) es va fer el solapament de les imatges obtingudes amb els dos filtres. Finalment l'eficiència de la infecció de les cèl·lules beta es va calcular com el percentatge de l'àrea ocupada per les cèl·lules marcades per insulina on s'expressava la proteïna verda fluorescent respecte l'àrea total de les cèl·lules marcades per insulina. Aquest procediment es va dur a terme mitjançant un programa d'anàlisi d'imatge (AnalySIS 3.0, Soft Imaging System, Münster, Alemanya).

Per tal d'observar la colocalització de la proteïna verda fluorescent amb la insulina en els empelts d'illots infectats, es va marcar la insulina per immunohistoquímica utilitzant el mateix anticòs primari abans esmentat i per visualitzar el marcatge es va utilitzar un anticòs anti-IgG de conill conjugat amb Alexa Fluor® 546 (Molecular probes, Leiden, The Netherlands) (1:200). Les seccions es van visualitzar en un microscopi de fluorescència convencional (Olympus BX51) per tal d'observar el doble marcatge (GFP-insulina) o bé en un microscopi confocal (TCS-SL Spectral Confocal Microscope, Leica) que ens permeté veure colocalitzacions entre ambdues proteïnes.

### **13.2.- Marcatge dels macròfags**

Per tal d'identificar la presència de macròfags en els illots aïllats i després del trasplantament es va fer una immunohistoquímica contra l'antigen CD68. Aquesta proteïna de 110 KDa es troba majoritàriament en

l'espai intracel·lular dels monòcits/macròfags i ha estat extensament utilitzada com a marcador de macròfags en diferents tipus de teixits incloent els illots pancreàtics.

La presència de macròfags es va determinar tant en els illots aïllats abans del trasplantament com en els empelts d'illots de 3, 10 i 28 dies d'evolució. Com a control positiu de la tècnica es va utilitzar una melsa de rata. Després de la desparafinització es varen bloquejar les peroxidases endògenes amb una solució de de peròxid d'hidrogen a l'1% durant 15 min. L'exposició de l'antigen es va dur a terme per ebullició de les preparacions en tampó citrat durant 20 min. El bloqueig de les unions inespecífiques es va dur a terme amb serum de caball (Biological industries, Beit Haemek, Israel) al 5% durant 1h. a temperatura ambient. La incubació amb l'anticòs primari (IgG de ratolí anti CD68 de rata, dilució 1:100, Serotec, Oxford, U.K) es va realitzar a 4°C durant tota la nit. La visualització del marcatge es va realitzar amb el kit Envision+® System-HRP (DakoCytomation) seguint les instruccions del fabricant. Finalmet les seccions es van contratenyir amb hematoxilina de Harris i es van visualitzar al microscopi.

### **13.3.- Expressió d'IL-1Ra en els illots abans i després del trasplantament**

La visualització de les cèl·lules dels illots que expressaven IL-1Ra es va fer per immunohistoquímica de preparacions d'illots control no infectats i Ad-IL-1Ra just abans de trasplantar i d'empelts d'illots dels dos grups de 3 dies.

La inhibició de les peroxidases endògenes, l'exposició de l'antigen i el bloqueig de les unions inespecífiques es va realitzar igual que per la detecció dels macròfags. Posteriorment, les preparacions es van incubar amb un anticòs de cabra anti-IL-1Ra humana (1:20) (R&D systems, Minneapolis, MN) a 4°C durant tota la nit i la visualització del marcatge es va realitzar mitjançant el kit LSAB+® System-HRP (DakoCytomation).

Finalment, les preparacions es van contratenyir amb hematoxilina de Harris i es van visualitzar al microscopi.

### **13.4.- Determinació de l'apoptosi de les cèl·lules beta**

L'apoptosi de les cèl·lules beta va ser determinada per la tècnica del TUNEL. Amb aquesta tècnica es marquen els extrems  $3'OH$  de l'ADN. Aquests extrems es generen quan es produeixen talls internucleosomals de l'ADN. Com ja ha estat explicat anteriorment, durant l'apoptosi es produeixen aquests talls, i es dona una condensació del nucli. Així doncs, amb aquesta tinció es van poder diferenciar els nuclis de les cèl·lules apoptòtiques, tenyits i condensats, dels de la resta de les cèl·lules.

Les seccions es van desparafinar i es van tenyir per peroxidasa, en el cas dels nuclis marcats pel TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, ApopTag<sup>®</sup>, Intergene, Oxford, Regne Unit), i per fosfatasa alcalina les cèl·lules endocrines no beta dels illots.

La tècnica del TUNEL es basa en la transferència de nucleòtids marcats amb digoxigenina als extrems  $3'OH$  de l'ADN mitjançant l'enzim desoxinucleotidil transferasa (dT). Aquests nucleòtids van ser reconeguts per un anticòs anti-digoxigenina conjugat amb peroxidasa. La visualització dels nuclis marcats es va fer per l'addició del substrat de la peroxidasa, DAB i es va afegir peròxid d'hidrogen per catalitzar la reacció. Aquesta tinció es va realitzar seguint el protocol del fabricant de l'equipament.

Posteriorment, les seccions es van rentar amb aigua destilada i es van incubar amb una solució d'àcid acètic al 15% durant 15 min. per tal d'inhibir l'activitat de les fosfatases endògenes. El bloqueig de les unions inespecífiques es va fer amb sèrum de xai al 5% (Gibco BRL, Invitrogen, Paisley, Regne Unit) durant 20 min. a temperatura ambient. Després es van fer rentats de les seccions amb PBS i Tween al 0.2% i es van incubar amb una barreja d'anticossos (Dako): anticòs de conill anti-glucagó humà (dilució



final 1:1000), anticòs de conill anti-somatostatina humana (dilució final 1:1000), anticòs de conill anti-polipèptid pancreàtic humà (dilució final 1:500). Després de la incubació amb els anticòs primaris durant tota la nit a 4°C, les seccions es van rentar amb PBS- 0.05% Tween i es van incubar amb un anticòs secundari anti-Ig de conill (dilució final 1:200) que està marcat amb fosfatasa alcalina a temperatura ambient durant 3 hores. Finalment es van fer rentats amb Tris-HCl (pH 8.2) i es van incubar amb un anticòs anti-fosfatasa alcalina marcat amb fosfatasa alcalina (dilució final 1:50) durant 1 h a temperatura ambient. El revelat es va fer amb 5-bromo-4-cloro-3-indoïl fosfatasa/nitroblue tetrazolium líquid (Sigma), substrat de la fosfatasa alcalina durant 45 min. a temperatura ambient.

Per tal de visualitzar els nuclis i poder-los contar, es va fer una contratinció amb hematoxilina de Mayer (Sigma). Per a acabar, les preparacions es van muntar amb medi de muntatge aquós (Aquatex, Merck, Alemanya).

Es van tenir les cèl·lules endocrines no beta en lloc de les pròpies cèl·lules beta perquè en condicions d'hiperglucèmia severa existeix una degranulació de les cèl·lules beta que podria donar lloc a una tinció d'insulina molt feble o fins i tot negativa, donant falsos resultats. A més, una doble tinció citoplasmàtica i nuclear d'una mateixa cèl·lula podria confondre's i seria difícil la seva identificació.

Les cèl·lules beta i els nuclis apoptòtics es van comptar utilitzant un microscopi Olympus H2 connectat a una càmera digital i un monitor en color. A l'hora de comptar els nuclis apoptòtics es van excloure les regions necròtiques on es podien tenir falsos positius degut a l'important soroll de fons que incorporen aquestes àrees amb restes cel·lulars. L'apoptosi de les cèl·lules beta es va expressar com a percentatge de les cèl·lules beta que

eren positives per TUNEL. De totes les seccions es va comptar un mínim de 1000 cèl·lules beta.

### **13.3.- Determinació de la replicació de les cèl·lules beta**

L'estudi de la replicació de les cèl·lules beta dels illots es va fer per incorporació i posterior detecció de la bromodeoxiuridina (BrdU). Aquesta molècula és un anàleg de la timidina que serà incorporat en el DNA de les cèl·lules que es troben en la fase S del cicle cel·lular.

En els illots en cultiu, la BrdU (10  $\mu\text{M}$ ) (Amersham) es va afegir al medi 24 h abans de fixar les cèl·lules. En aquest cas el temps d'exposició a la BrdU fou més llarg per tal d'optimitzar el número de cèl·lules beta marcades, ja que la taxa de replicació d'aquestes cèl·lules en cultiu s'esperava que fos molt baixa en alguns grups.

En el cas dels illots trasplantats, la BrdU (Sigma) es va injectar intraperitonealment (100 mg/Kg) als animals que se'ls havia de fer l'extracció de l'empelt, 6h abans de l'extracció, ja que aquest és el temps que dura la fase S de les cèl·lules beta.

Després de la desparafinització, les preparacions es van submergir en peròxid d'hidrogen al 3% per inhibir les peroxidases endògenes, es van fer rentats i es van tractar amb tripsina (0.5 mg/ml) per tal de permeabilitzar les mostres. Posteriorment es van bloquejar les unions inespecífiques amb sèrum de xai al 5%. Per fer el marcatge de la BrdU es va fer servir un equipament comercial (Cell Proliferation Kit, Amersham) i se'n va seguir el protocol. El revelat es va fer amb DAB afegint un intensificador que contenia peròxid d'hidrogen, clorur de níquel i de cobalt. El paper d'aquest intensificador era generar un precipitat més fosc.

Després del revelat, les seccions es van rentar amb aigua corrent, es van incubar amb sèrum de xai i finalment amb la barreja d'anticossos (anti glucagó, somatostatina i pp) descrita prèviament, o bé amb un anticòs de conill anti-insulina humana (1:50) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Les seccions van ser incubades amb els anticossos a 4°C durant tota la nit, i després d'uns rentats amb PBS es van incubar amb l'anticòs secundari de porc, que reconeix les IgG de conill (dilució final 1:200) i està marcat amb peroxidasa, durant 3 h a temperatura ambient. Finalment, es van fer rentats amb Tris (pH 7.4) i les seccions s'incubaren amb l'anticòs terciari anti-peroxidasa que està marcat amb peroxidasa (dilució final 1:500) durant 1 h a temperatura ambient. Les cèl·lules endocrines es van visualitzar revelant les preparacions amb DAB i peròxid d'hidrogen. Les seccions es van contratenyir amb hematoxilina de Harris per visualitzar els nuclis de les cèl·lules i es van muntar amb medi de muntatge (DPX mountant for microscopyBDH , laboratory supplies, Poole, Anglaterra).

La replicació de les cèl·lules beta va ser expressada com a percentatge de les cèl·lules beta positives per la BrdU i van ser comptats un mínim de 1000 nuclis per secció.

#### **13.4.- Determinació de l'àrea individual de les cèl·lules beta**

Per estudiar l'evolució de la mida de les cèl·lules beta després del trasplantament, es va determinar l'àrea individual de les cèl·lules beta dels illots abans de trasplantar i dels empelts dels dies 3, 10 i 28 després del trasplantament.

La quantificació de l'àrea cel·lular es va fer a partir d'imatges obtingudes de seccions d'illots i d'empelts dels diferents dies tenyits per les hormones insulars glucagó, somatostatina i polipèptid pancreàtic i utilitzant

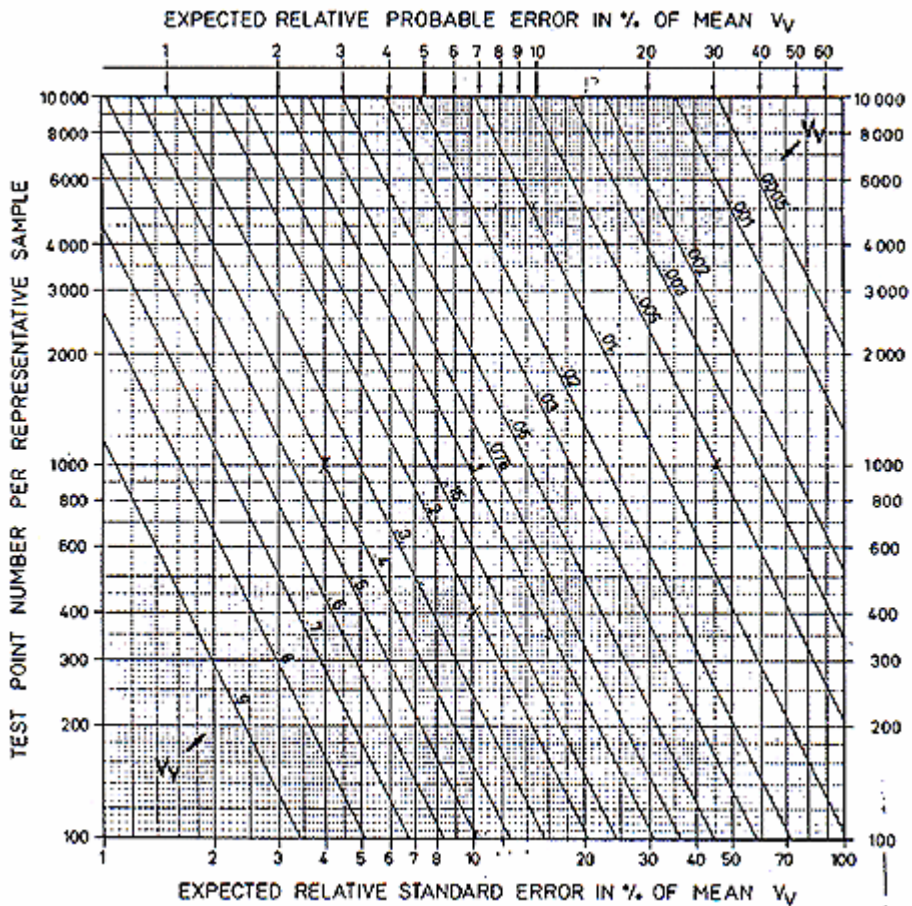
el programa d'anàlisi d'imatge AnalySIS 3.0. Aquest ens permet calcular l'àrea total beta de la imatge, que serà dividida pel número de nuclis de cèl·lules beta, obtenint l'àrea individual de cèl·lules beta. De cada secció es van agafar àrees de teixit beta que continguéssin un mínim de 190 nuclis.

### **13.5.- Determinació de la massa beta**

Els empelts i pellets d'illots que van ser utilitzats per determinar la massa de les cèl·lules beta, van ser pesats just després de la fixació amb PFA al 4%. Per fer-ho, es va retirar l'excedent de fixador dels empelts i dels pellets de 500 illots per capilaritat i es van pesar en una balança analítica de precisió Mettler tipus A240 (Mettler instruments Corporation, Estats Units).

La massa de les cèl·lules beta dels empelts d'illots es va calcular per morfometria per comptatge de punts<sup>2</sup>. Per fer-ho s'utilitzaren seccions amb les cèl·lules endocrines no beta marcades, per tal de separar les cèl·lules beta de les no beta insulars i de la resta del teixit de l'empelt. Els talls es van visualitzar en un monitor en color i a la imatge obtinguda s'hi va superposar una planeta de 48 punts. La determinació del volum relatiu de les cèl·lules beta es va fer dividint els punts que interceptaven cèl·lules beta entre el total de punts comptats sobre el teixit. Un cop obtingut el volum relatiu, aquest es multiplica pel pes de l'empelt per tal d'obtenir la massa cel·lular, assumint que 1 cm<sup>3</sup> de teixit pesa 1 g.

Per tal de determinar el número de punts necessaris per a obtenir una mostra representativa es va utilitzar un nomograma que relaciona el nombre de punts comptats amb el volum relatiu de les cèl·lules i l'error estàndard esperat expressat com a percentatge de la mitja. Aquest error va ser inferior al 10% en tots els casos.



**Fig. 3. Nomograma** que relaciona el nombre de punts contats amb el volum relatiu  $V_V$  i l'error relatiu estàndard esperat (en % de la mitjana). Extret de Weibel ER, *Stereological Methods*, 1979.

La massa de les cèl·lules beta i no beta inicialment transplantada va ser determinada en grups de 500 illots control i infectats amb Ad-IL-1Ra per planimetria utilitzant el programa d'anàlisi d'imatge AnalySIS 3.0.

### **13.6.- Determinació de la necrosi insular**

La mesura de les àrees necròtiques dels empelts de 3 dies es va realitzar per morfometria per comptatge de punts a les mateixes seccions on es va quantificar la massa de les cèl·lules beta. Les seccions es van visualitzar en un monitor en color i a la imatge obtinguda s'hi va superposar una planeta de 48 punts. L'àrea necròtica es va expressar com a percentatge dels punts que interceptaren teixit necròtic dividit per la suma dels punts que coincidien amb el teixit insular i els que ho feien amb el teixit necròtic.

### **14.- Viabilitat cel·lular per microscopia**

La viabilitat dels illots infectats es va comprovar en el microscopi invertit de fluorescència mitjançant una tinció amb Bromur d'Etidi (EtBr) i Taronja d'Acridina (AO).

El bromur d'etidi és un marcador que s'intercala en els àcids nucleics de les cèl·lules. A l'igual que el iodur de propidi, ho fa estequiòmicament (1 molècula cada 4-5 parells de bases d'àcid nucleic) i no és permeable, és a dir, no pot travessar les membranes citoplasmàtica i nuclear. D'aquesta manera només marcarà el DNA de les cèl·lules mortes, ja que són les que tenen aquestes membranes danyades. Aquest marcador emet llum vermella (605 nm) quan se l'excita a una longitud d'ona al voltant de 500 nm.

El taronja d'acridina és un marcador que també interacciona amb els àcids nucleics, intercalant-se o bé unint-se electrostàticament. A diferència dels altres marcadors anomenats anteriorment, aquest és permeable, és a dir, és capaç de travessar les membranes cel·lulars, d'aquesta manera ens marcarà les cèl·lules que estan vives. Aquest marcador emet llum verda (525 nm) quan és excitat amb una longitud d'ona de 500 nm.

Després de la infecció amb Ad-LacZ, els illots es van cultivar amb RPMI 1640, 10% FCS i 11.1 mM de glucosa durant 48h. Posteriorment grups de 30 illots es van rentar amb PBS i es van incubar amb una solució que contenia 0.25 µg/ml de taronja d'acridina i 5 µg/ml de bromur d'etidi. Immediatament els illots van ser visualitzats sota el microscopi invertit de fluorescència (Leica).

### **15.- Secreció d'insulina en resposta a glucosa**

Com a marcador de la funció de les cèl·lules beta dels illots infectats amb adenovirus es va utilitzar la secreció d'insulina estimulada per glucosa. Mitjançant aquest test vàrem poder analitzar si la capacitat de les cèl·lules beta per respondre a glucosa estava conservada en els illots infectats.

Els illots que havien estat infectats amb Ad-IL-1Ra i els seus controls es van deixar en cultiu durant 48h amb medi RPMI 1640, 10% FCS i 11.1 mM de glucosa a 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Després d'aquest temps els illots es van rentar amb tampó bicarbonat Krebs- Ringer suplementat amb BSA i Hepes (KRBH) (115 mM NaCl, 24 mM Na HCO<sub>3</sub>, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES i 0.5% BSA, pH 7.4) que contenia 2.8 mM de glucosa. Posteriorment triplicats de 10 illots es van establir amb aquest mateix tampó durant una hora a 37°C, en agitació contínua. Després, els illots es van incubar amb 1 ml de KRBH que contenia 2.8 o 16.7 mM de glucosa a 37°C durant una hora en agitació. Finalment es van recollir els sobrenadants i es van desar a -80°C fins que es realitzà la determinació de la insulina secretada. Aquesta determinació es va fer mitjançant un ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) comercial (MercoDIA Rat insulin ELISA, MercoDIA AB, Uppsala, Suècia) seguint les instruccions del fabricant. La lectura de la placa es va fer en un lector d'absorbància de plaques d'ELISA (Labsystems Multiskan RC, Labsystems, Altrincham, Regne Unit) i l'anàlisi de les dades es realitzà amb el programa Genesis 2.16 (Labsystems, Albertville, Mi, Estats Units).

## 16.- Determinació del DNA

Es va quantificar el DNA dels illots utilitzats en el test de secreció d'insulina per tal de corregir la quantitat d'insulina secretada al medi per la quantitat de cèl·lules secretores.

Un cop finalitzada la secreció d'insulina, es van rentar els illots amb un tampó fosfat (2 M NaCl, 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2 mM EDTA) per tal d'eliminar les restes d'albúmina, ja que aquesta interfereix en la quantificació del DNA, i es van sonicar (3 polsos × 10 s, amplitud 80). L'homogenat dels illots es va barrejar amb 0.9 µg/ml de Hoechst 33258 (Sigma) (longitud d'ona d'excitació 356 nm, i longitud d'ona d'emissió 448 nm) i es va quantificar el DNA en el fluorímetre (F-2000, Hitachi Ltd., Tokyo, Japó), utilitzant una corba patró de DNA de timus de vedella.

## 17.- Expressió del gen d' IL-1β

Per estudiar l'expressió del gen de la IL-1β es va fer l'extracció del RNA total dels illots acabats d'aïllar i després de 24h de cultiu amb medi RPMI 1640, 10% FCS i 11.1 mM de glucosa.

### 17.1.- Extracció d'RNA total

L'extracció del RNA es va realitzar utilitzant un equipament comercial (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Crawley, Regne Unit). Els illots es van homogeneïtzar amb una solució de lisi que contenia 2-mercaptoetanol pipetejant 100 vegades amb una pipeta automàtica. Seguidament es va centrifugar l'homogenat i el sobrenedant es va fer passar per una columna amb una membrana de sílica gel a la que s'hi uní el RNA. Després dels rentats de la membrana, el RNA es va eluir amb aigua-DEPC i se'n va determinar la concentració i puresa mesurant l'absorbància en un espectrofotòmetre. La integritat del RNA es va comprovar per visualització en un gel d'agarosa a l'1.5%.



## 17.2.- Síntesi de cDNA

La síntesi del cDNA es va fer a partir d'1 µg de RNA total. Partint de que aquest RNA obtingut podia estar contaminat amb DNA genòmic, i per evitar que aquest ens pogués donar falsos positius en els resultats de PCR, es va eliminar de la mostra mitjançant un tractament amb DNasa I. Per fer-ho, les mostres es van incubar amb 1 U/µl de DNasa I (Promega) a 37°C durant 30 min. La inactivació de l'enzim es va fer per calor a 65°C durant 10 min.

Per sintetitzar el cDNA es van utilitzar hexanucleòtids amb seqüències aleatòries que s'uniren a qualsevol seqüència de RNA transcribint-les totes, sense tenir més afinitat per unes que per altres. Primer el RNA lliure de DNA es va incubar amb els encebadors (0.5 µg/µl) i els nucleòtids (dNTPs) (10mM) a 65°C durant 10 min. En aquest procés el RNA es desnaturalitzà i així els encebadors tenien accessibilitat a les seqüències de nucleòtids. Després, a la solució es va afegir el tampó de l'enzim (Gibco), 0.1 M DTT (Gibco) i 40 U RNasin (inhibidor de les RNases) (Promega) i es va incubar a 42°C durant 2 min. Finalment es va afegir la transcriptasa inversa (Superscript II RNasa H<sup>-</sup>, Invitrogen) i es va donar la síntesi del cDNA durant 50 min. a 42°C. Un cop finalitzat el procés de retrotranscripció, la inactivació de l'enzim es va fer a 72 °C durant 15 min. Totes les incubacions es van realitzar en el termociclador Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, Estats Units)

### 17.3.- PCR a temps real

Aquesta tècnica consisteix en l'amplificació d'una seqüència de DNA concreta per tal de que sigui detectable. Aquest principi és el que comparteix amb la clàssica PCR, però el fet de que sigui a temps real permet que es pugui seguir l'amplificació del gen des del moment en que comença.

La sensibilitat i reproducibilitat d'aquesta tècnica va fer que la escollíssim per mirar l'expressió del gen de IL-1 $\beta$ , ja que no s'espera que tingui una gran expressió basal.

L'estudi d'expressió gènica es va dur a terme en el termociclador ABI Prism<sup>®</sup> 7700 (Applied Biosystems, Warrington, Regne Unit) en combinació amb la tecnologia TaqMan. Aquesta tecnologia es basa en la utilització d'una sonda que reconeix un petit fragment de la seqüència del gen problema que porta unides dues molècules, en l'extrem 5' porta unit un marcador fluorescent (*reporter*) i en el 3' porta unit un reductor de l'emissió (*quencher*). Quan la sonda està sencera, el *quencher* absorbeix la fluorescència emesa pel *reporter*. En el moment en què la seqüència de nucleòtids del DNA sigui accessible a la sonda, aquesta s'hi unirà. Aquesta unió sempre es donarà *downstream* d'algun dels dos primers, per tant durant l'elongació, la sonda serà degradada per l'activitat 5' nucleasa de la Taq DNA polimerasa. Aquesta degradació fa que el *reporter* se separi del *quencher*, llavors hi ha emissió de fluorescència que detecta l'aparell. Per cada cicle, més molècules de *reporter* són alliberades, produint-se un augment de la fluorescència proporcional a la quantitat d'amplicó generat.

La quantificació de l'expressió del gen de la IL-1 $\beta$  es va fer utilitzant PDRs (Pre-Developed TaqMan<sup>®</sup> Assay Reagents, Applied Biosystems) que

estan dissenyats per tenir una eficiència similar d'amplificació que permet utilitzar el mètode comparatiu  $C_T$  (Threshold Cycle). Aquest mètode es basa en un seguit de fòrmules aritmètiques que es poden utilitzar quan les eficiències d'amplificació del gen problema i del normalitzador són similars. Tot i que la utilització de PDARs ens permetia utilitzar el mètode comparatiu sense haver-lo de validar, nosaltres ho vàrem fer per tal d'establir el llindar de fluorescència en el que es faria la comparació dels  $C_T$ .

La validació del mètode es va fer a partir d'una mostra que se sabia que expressava la IL-1 $\beta$  i se'n van fer 4 dilucions (1, 1:10, 1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup>) per detectar el gen problema (IL-1 $\beta$ ), i 4 per detectar el gen normalitzador (18S) (1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>5</sup>, 1:10<sup>6</sup>). El gen normalitzador es va diluir més per l'elevada quantitat en què es trobava en la mostra. Després de l'amplificació dels gens es va passar a fer la validació del mètode comparatiu. Aquest serà vàlid si es compleix que el pendent de la recta que s'obté de representar el logaritme de la quantitat inicial del motlle contra la diferència de  $C_T$  entre el gen problema i el normalitzador no és significativament diferent de zero. Això equival a dir que les rectes estàndard dels dos amplicons són paral·leles, entenenent com a recta estàndard la que relaciona la concentració inicial del motlle amb el valor  $C_T$ . En aquest cas el supòsit es va complir i vàrem poder establir el llindar.

El gen problema i el normalitzador es van amplificar en pouets diferents i de cada mostra es van fer triplicats. Les reaccions es van dur a terme a partir d' 1  $\mu$ l de cDNA, que equivalia a 25 ng de RNA, 2  $\times$  TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix, 20  $\times$  encebadors i sonda de la IL-1 $\beta$  o del 18S (PDAR) en un volum final de 25  $\mu$ l. Finalment, les condicions de la reacció van ser les següents: 10 min. a 90°C per desnaturalitzar el cDNA, seguit de 40 cicles de 15 seg. a 95 °C i 1 min. a 60°C per a que es donés l'amplificació de la seqüència.

#### 17.4.- Anàlisi dels resultats

Les dades de l'amplificació es van obtenir mitjançant el programa SDS (Applied Biosystems) i a partir d'aquí l'anàlisi dels resultats es va fer amb l'Excel (Microsoft, CA, USA).

Hem de tenir en compte que per cada mostra l'amplificació es va fer per triplicat, així que abans de fer cap càlcul ni aplicar cap fórmula, es van fer les mitjanes dels triplicats dels  $C_T$  tant de la IL-1 $\beta$  com del 18 S. Llavors es va aplicar la següent fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

on  $\Delta C_T$  és la diferència de  $C_T$  entre la mostra problema (IL-1 $\beta$ ) i el normalitzador (18S)

$\Delta\Delta C_T$  és la diferència entre  $\Delta C_T$  mostra i  $\Delta C_T$  mostra de referència.

En aquest cas la mostra referència va ser la mitjana dels  $\Delta C_T$  dels illots frescos. Aquest experiment es va dur a terme mitjançant una única reacció de RT i de PCR que inclogué totes les mostres.

#### 18.- Anàlisi Estadística

Els resultats es van expressar com a mitjana i error estàndard de la mitjana ( $X \pm EEM$ ). Els càlculs es van fer utilitzant el programa estadístic SPSS<sup>®</sup> versió 10.0 per Windows (SPSS Inc., USA). Per fer comparacions múltiples entre grups s'utilitzà l'anàlisi de la variança (ANOVA). Quan l'ANOVA va ser significativa ( $p < 0.05$ ), es va utilitzar el mètode PLSD de Fisher per a determinar les diferències específiques entre els diferents grups analitzats.

Quan els valors no van seguir una distribució normal es van utilitzar mètodes estadístics no paramètrics; en el cas de les comparacions múltiples es va utilitzar el test de Kruskal-Wallis, i quan aquest fou significatiu ( $p < 0.05$ ) es va aplicar el test de Mann-Whitney per trobar les diferències específiques entre els diferents grups ( $p < 0.05$ ).

**BIBLIOGRAFIA CITADA AL MATERIAL I MÈTODES**

1. Bell RC, Khurana M, Ryan EA, Finegood DT (1994) Gender differences in the metabolic response to graded numbers of transplanted islets of Langerhans. *Endocrinology* 135:2681-2687
2. Weibel ER: Point counting methods. In *Stereological Methods*. Vol 1. London, Academic Press, 1979, p. 101-161



**Resultats**





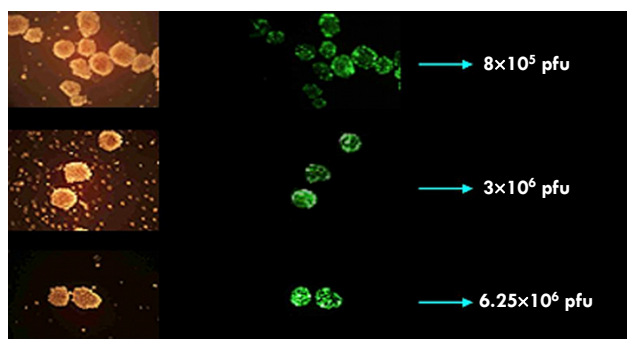
## Estudi de l'efecte d'IL-1 $\beta$ i de la sobreexpressió d'IL-1Ra en els illots en cultiu

### 1.- Infecció dels illots amb adenovirus

#### 1.1.- Eficiència de la infecció

Per tal de trobar la concentració d'adenovirus adequada per infectar els illots i obtenir una bona eficiència de la infecció sense alterar-ne la viabilitat, es van fer infeccions a  $8 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^6$  i  $6.25 \times 10^6$  pfu d'adenovirus que codificaven pel gen de la proteïna verda fluorescent (GFP). Per dur a terme aquest primer criatge, els illots infectats amb Ad-GFP van ser visualitzats en el microscopi invertit de fluorescència que ens permeté fer una valoració aproximada de l'eficiència de les diferents infeccions. (Fig.1)

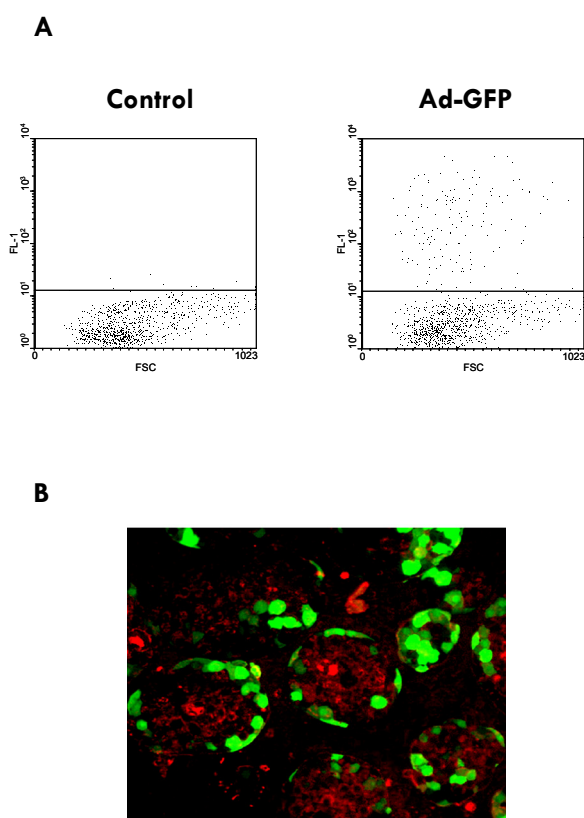
Quan els illots es van infectar just després de l'aïllament, el 100% d'aquests presentava cèl·lules que expressaven GFP a totes les pfu utilitzades, en canvi, quan els illots s'havien cultivat 18h després de l'aïllament, no tots resultaven infectats independentment de les pfu utilitzades. Així doncs vàrem decidir infectar els illots just després del procés de l'aïllament. En el cas dels illots infectats després de l'aïllament la intensitat de fluorescència emesa per les cèl·lules dels illots augmentava amb la concentració utilitzada d'adenovirus, així doncs, les quantificacions de l'eficiència de la infecció, viabilitat i funció de les cèl·lules dels illots, es van determinar en els illots infectats amb  $6.25 \times 10^6$  pfu d'adenovirus.



**Fig. 1.** Infecció dels illots just després de l'aïllament amb diferents concentracions d'Ad-GFP. Visualització en el microscopi invertit.

## Resultats

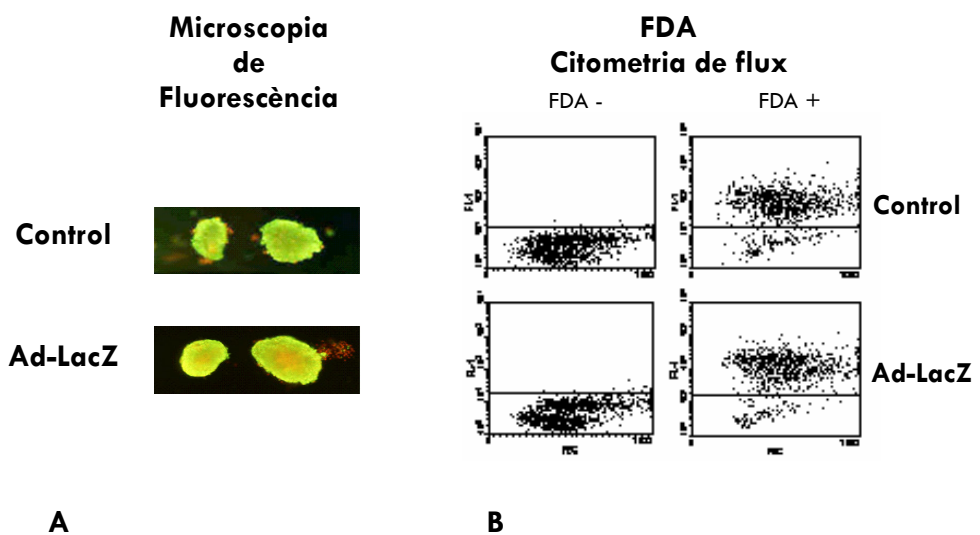
L'eficiència de la infecció de les cèl·lules dels illots infectats amb  $6.25 \times 10^6$  pfu d'adenovirus determinada per citometria de flux fou d'un 25-30% (Fig.2A). Per immunohistoquímica varem determinar el nombre de cèl·lules beta que expressaven la proteïna exògena, i saber la distribució dintre l'illot de les cèl·lules infectades. Tot i que la major part de les cèl·lules infectades es trobaven en la perifèria dels illots, un  $25.8 \pm 1.77\%$  de les cèl·lules beta dels illots expressaven la GFP (Fig.2B).



**Fig. 2. Eficiència d'infecció a  $6.25 \times 10^6$  pfu..** **A.** Citometria de flux de les cèl·lules dispersades dels illots infectats amb Ad-GFP 48h després del cultiu. FL-1 detecta la fluorescència verda. **B.** Imatge a 400X d'illots en cultiu 48h després de la infecció. Les cèl·lules vermelles fluorescents són positives per insulina, i les verdes per GFP

### 1.2.- Viabilitat cel·lular dels illots

La viabilitat dels illots mesurada per taronja d'acridina / bromur d'etidi va ser d'entre 80-90% tant en el cas dels illots control com en el dels illots infectats amb Ad-LacZ. S'obtingueren els mateixos resultats quan la viabilitat es va determinar per citometria de flux marcant les cèl·lules vives amb FDA (Fig.3).

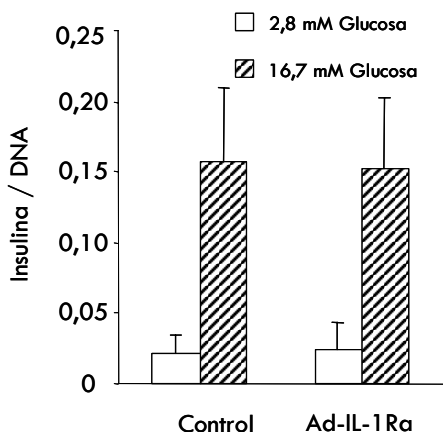


**Fig. 3.- Viabilitat cel·lular dels illots.** 48 h després de la infecció es va determinar la viabilitat dels illots control i dels infectats amb  $6.25 \times 10^6$  pfu d'Ad-LacZ. **A)** Taronja d'acridina / Bromur d'etidi visualitzats sota el microscopi invertit de fluorescència. **B)** Cèl·lules d'illots dispersats marcades amb FDA i analitzades per citometria de flux. FL-1 detecta la fluorescència verda.

## Resultats

### 1.3.- Funció de les cèl·lules beta dels illots

Un cop establert que la viabilitat de les cèl·lules dels illots no estava afectada per la infecció amb els adenovirus, el proper pas va ser comprovar que la funció de les cèl·lules beta tampoc estava alterada. Com a marcador de funció beta es va utilitzar la capacitat de les cèl·lules beta per secretar insulina en resposta a glucosa. Els illots control i els infectats amb Ad-IL-1Ra presentaven una secreció d'insulina similar (Fig.4).

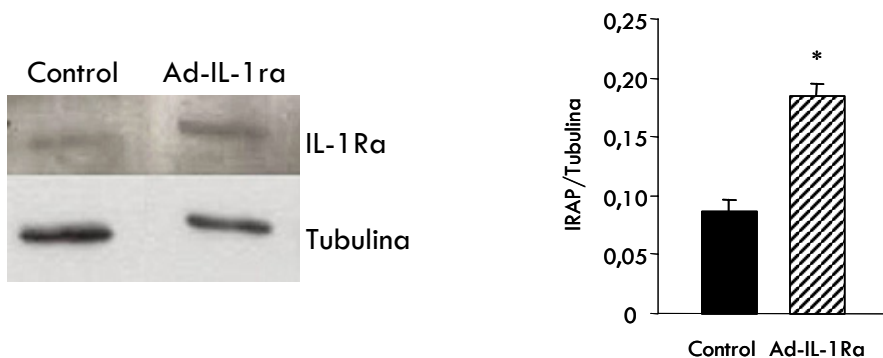


**Fig. 4.- Secreció d'insulina en resposta a glucosa.** 48h després de la infecció tant els illots control com els infectats amb Ad-IL-1Ra presentaven la mateixa secreció en resposta a la glucosa, demostrant que l'adenovirus no altera la funció beta. La secreció d'insulina està expressada com ng d'insulina/10 illots/1h i el DNA com ng de DNA/10 illots. n = 3

### 1.4.- Expressió de l'antagonista del receptor d'IL-1 (IL-1Ra)

Un cop demostrat que la transferència d'un gen en els illots es podia fer eficientment utilitzant adenovirus com a vector d'expressió, vàrem comprovar que la nostra proteïna problema, IL-1Ra, estava sobreexpressada en els illots infectats amb Ad-IL-1Ra. 48h després de la infecció es va fer l'extracció de les proteïnes tant dels illots control com dels infectats amb Ad-IL-1Ra i es van analitzar per Western blot. La quantitat de proteïna es va calcular per densitometria de la banda corresponent a IL-

1Ra que aparegué en la pel·lícula, i es va corregir per la densitometria de la banda corresponent a la tubulina (Fig.5). Els illots no infectats expressaven IL-1Ra després de 48h de cultiu ( $0.08 \pm 0.01$  unitats arbitràries), i la infecció amb Ad-IL-1Ra va resultar amb un augment significatiu de la sobreexpressió d'IL-1Ra ( $0.18 \pm 0.01$  unitats arbitràries) ( $p < 0.001$ ).



**Fig. 5.- Detecció d'IL-1Ra en els illots.** Western blot d'extractes proteics d'illots cultivats 48h després de la infecció. Els resultats estan expressats com la mitja  $\pm$  error estàndard. ( $n = 3$ ) \* $p < 0.001$

## 2.- La sobreexpressió d'IL-1Ra protegeix les cèl·lules beta de l'apoptosi induïda per IL-1 $\beta$

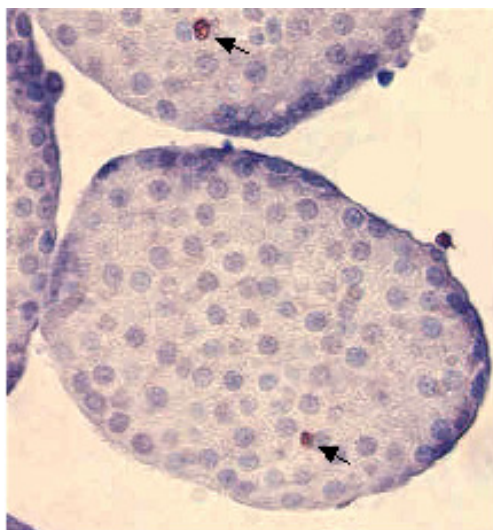
Els illots que havien estat exposats a 50 U/ml d'IL-1 $\beta$  durant 48 h havien perdut la seva estructura esfèrica i compacta característica, i eren de mides inferiors als illots que no havien estat incubats amb la citoquina.

L'apoptosi de les cèl·lules beta, determinada per la tècnica del TUNEL, es va veure significativament augmentada en els illots que havien estat exposats a la citoquina durant 48 h (Fig. 7). Cal remarcar que les diferents concentracions de glucosa no van tenir cap efecte sobre l'apoptosi de les cèl·lules beta pancreàtiques tant en presència com en absència de la

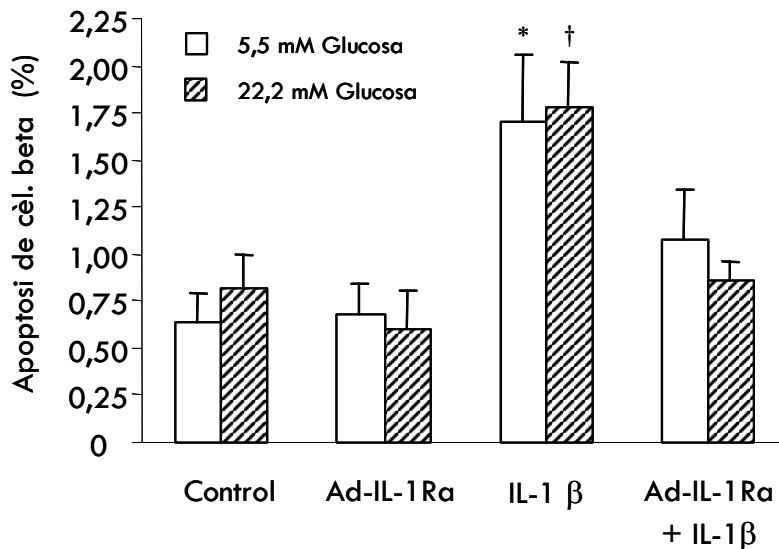
## Resultats

IL-1 $\beta$ . La sobreexpressió d'IL-1Ra va protegir els illots de l'apoptosi induïda per la citoquina tant a alta com a baixa concentració de glucosa, tot i que la protecció va ser més evident en el cas dels illots cultivats a 22.2 mM de glucosa. L'apoptosi de les cèl·lules beta dels illots cultivats a 22.2 mM de glucosa i 50 U/ml de IL-1 $\beta$  estava significativament augmentada en els illots que no havien estat infectats ( $1.77 \pm 0.24\%$ ,  $p < 0.05$ ) comparada amb la dels illots que sobreexpressaven IL-1Ra ( $0.86 \pm 0.09\%$ ) i amb els illots control no exposats a la citoquina ( $0.82 \pm 0.19\%$ ).

En el cas dels illots cultivats a 5.5 mM de glucosa i exposats a IL-1 $\beta$ , els nivells d'apoptosi de les cèl·lules beta dels illots que sobreexpressaven IL-1Ra es trobaven en un terme mig ( $1.07 \pm 0.27\%$ ), entre els dels illots no infectats i exposats a IL-1 $\beta$  ( $1.70 \pm 0.36\%$ ) i els dels illots control no cultivats amb la citoquina ( $0.64 \pm 0.15\%$ ,  $p < 0.05$  vs illots no infectats exposats a IL-1 $\beta$ )(Fig.7).



**Fig. 6. Micrografia d'un pellet d'illots** cultivats marcats per TUNEL en marró (fletxes) i en blau-lilós, hormones glucagó, somatostatina i polipèptid pancreàtic



**Fig. 7.- Apoptosi de les cèl·lules beta** induïda per IL-1 $\beta$ , en els illots control i en els que sobreexpressen IL-1Ra (grup Ad-IL-1Ra) incubats a 5.5 o 22.2 mM de glucosa durant 48 h en presència o absència de 50 U/ml de IL-1 $\beta$ . Els valors són les mitges  $\pm$  error estàndard i són el resultat de 5 experiments. ANOVA,  $p < 0.05$  entre tots els grups cultivats a 5.5 mM de glucosa; Fisher PLSD,  $*p < 0.05$  entre illots control incubats amb IL-1 $\beta$  a 5.5 mM de glucosa, i illots control i illots Ad-IL-1Ra no exposats a IL-1 $\beta$  a 5.5 mM de glucosa. ANOVA,  $p < 0.005$  entre tots els grups cultivats a 22.2 mM de glucosa; Fisher PLSD,  $†p < 0.05$  entre els illots control incubats amb IL-1 $\beta$  a 22.2 mM de glucosa i tots els altres grups incubats a 22.2 mM de glucosa.

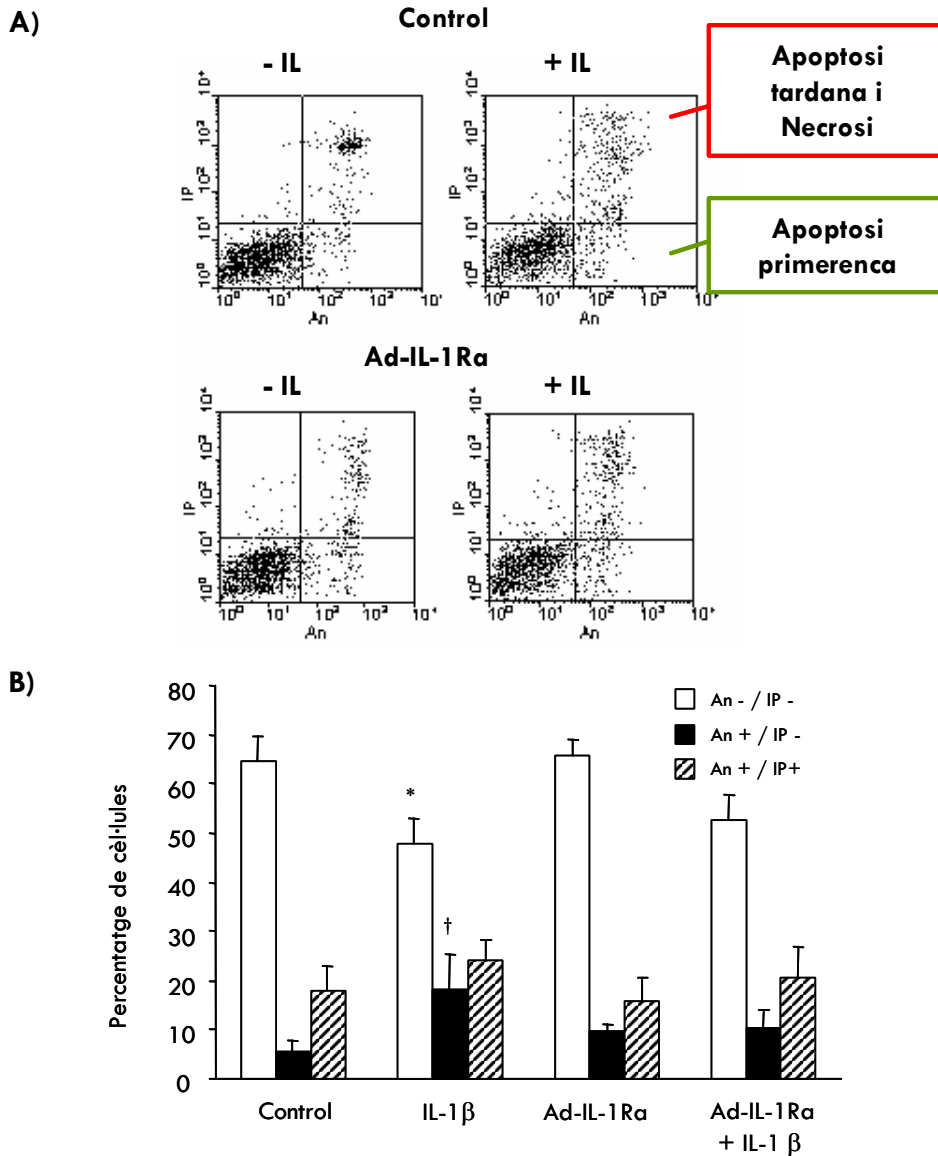
## Resultats

Tenint en compte que la tècnica del TUNEL té molts detractors per la dificultat i possible subjectivitat a l'hora de separar les cèl·lules apoptòtiques de les necròtiques, es van comprobar els resultats per citometria de flux, marcant les cèl·lules amb anexina V i iodur de propidi. En aquest cas l'apoptosi i la necrosi de les cèl·lules de l'illot es va determinar en els illots cultivats a 22.2 mM de glucosa amb o sense 50 U/ml de IL-1 $\beta$ .

Els resultats d'apoptosi obtinguts amb aquesta tècnica van ser del tot comparables amb els obtinguts anteriorment per la tècnica del TUNEL (Fig. 8). Cal dir que els percentatges d'apoptosi es veien augmentats respecte els obtinguts per immunohistoquímica, això pot ser degut a que amb la tècnica del TUNEL es detecten les cèl·lules que moren per apoptosi ja en la fase final del procés i amb el marcatge amb l'anexina V/iodur de propidi s'inclouen les diferents fases del procés, des de les més primerenques (inicials) fins a les més tardanes. A més, tal i com s'ha comentat al *material i mètodes*, les zones necròtiques dels illots, que poden contenir cèl·lules apoptòtiques, no es van tenir en compte en els comptatges del TUNEL per la dificultat que suposava la diferenciació dels nuclis apoptòtics dels necròtics.

Així doncs, la protecció conferida per la sobreexpressió d'IL-1Ra en els illots contra l'apoptosi induïda per la IL-1 $\beta$  detectada per la tècnica del TUNEL, va ser ratificada per citometria de flux. Els illots cultivats durant 48 h amb 50 U/ml d'IL-1 $\beta$  presentaren més cèl·lules apoptòtiques que els illots control ( $18.27 \pm 6.88\%$  vs  $5.52 \pm 2.14\%$ ,  $p < 0.05$ ), i en el cas dels illots que sobreexpressaven IL-1Ra aquesta apoptosi es va veure reduïda ( $10.34 \pm 3.78\%$ ,  $p = \text{n.s.}$ ) (Fig. 8).



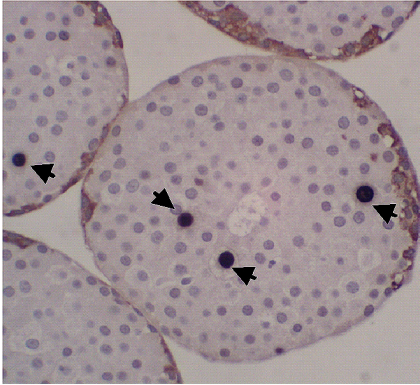


**Fig. 8.- Mort de les cèl·lules de l'illot** determinada per citometria de flux utilitzant anexina V (An) i iodur de propidi (IP), en illots control i en illots que sobreexpressaven IL-1Ra (grup Ad-IL-1Ra) incubats a 22.2 mM de glucosa durant 48h, en presència o absència de 50 U/ml de IL-1 $\beta$ . **A)** Imatge obtinguda de les poblacions de cèl·lules marcades amb anexina V (An) i iodur de propidi (IP). **B)** An - / IP - indiquen les cèl·lules viables, An + / IP- cèl·lules apoptòtiques, i An + / IP + cèl·lules necròtiques. Els valors són les mitges  $\pm$  error estàndard i són el resultat de 5 experiments. ANOVA,  $p < 0.05$ , Fisher PLSD, \* $p < 0.05$  An - / IP - IL-1 $\beta$  vs An - / IP - grup control; † $p < 0.05$  An + / IP - IL-1 $\beta$  vs An + / IP - grup control.

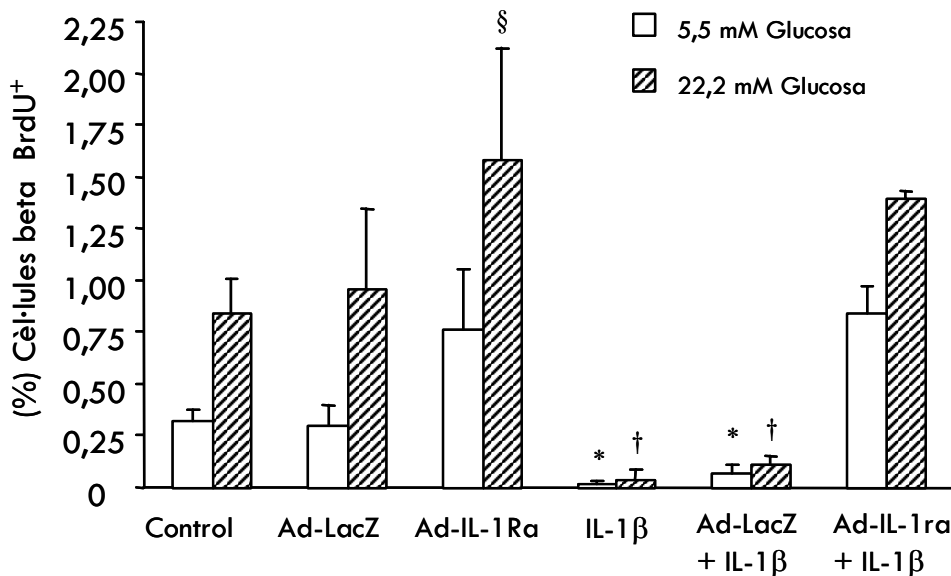
### **3.- La sobreexpressió d'IL-1Ra en els illots augmenta la replicació de les cèl·lules beta i les protegeix dels efectes deleteris que té IL-1 $\beta$ sobre la proliferació.**

Per tal d'estudiar el possible efecte deleteri de la IL-1 $\beta$  sobre la replicació de les cèl·lules beta, els illots es van cultivar a baixa i alta concentració de glucosa i en presència o absència de la citoquina. Tal i com ja esperavem, la replicació de les cèl·lules beta estava significativament augmentada en els illots exposats a concentracions elevades de glucosa (5.5 mM:  $0.29 \pm 0.04\%$ ; 22.2 mM:  $0.84 \pm 0.17\%$ ,  $p < 0.05$ ); en canvi, es va veure pràcticament abolida quan els illots van ser exposats a IL-1 $\beta$ , tant a alta com a baixa concentració de glucosa (5.5 mM + IL-1 $\beta$ :  $0.02 \pm 0.02\%$ ; 22.2 mM + IL-1 $\beta$ :  $0.05 \pm 0.05\%$ ) (Fig. 10). Aquest efecte es va veure tant el cas dels illots control com en el dels illots infectats amb l'adenovirus que codificava pel gen de la  $\beta$ -galctosidasa. La sobreexpressió d'IL-1Ra va prevenir completament l'efecte deleteri de la IL-1 $\beta$  sobre la replicació de les cèl·lules beta pancreàtiques tant a 5.5 mM (Ad-IL-1ra + IL-1 $\beta$ :  $0.84 \pm 0.14\%$ ) com a 22.2 mM de glucosa (Ad-IL-1ra + IL-1 $\beta$ :  $1.22 \pm 0.15\%$ ) (Fig. 10).

Cal remarcar que la infecció dels illots amb adenovirus no va afectar la replicació de les cèl·lules beta, a més, els illots que sobreexpressaven IL-1Ra presentaven uns nivells de replicació significativament incrementats respecte els illots control i els infectats amb Ad-LacZ.



**Fig. 9.-** Micrografia d'un pellet d'illots cultivats marcats per BrdU en negre (fletxes) i en marró, hormones glucagó, somatostatina i polipèptid pancreàtic

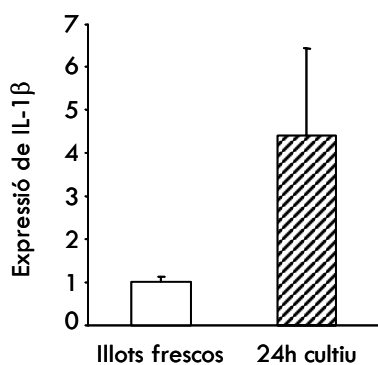


**Fig. 10.-** Replicació de les cèl·lules beta en illots control i infectats amb Ad-LacZ i Ad-IL-1Ra incubats a 5,5 o 22,2 mM de glucosa durant 48 h. en presència o absència de 50 U/ml de IL-1β. Els valors són les mitjanes ± Error estàndard de 5 experiments independents. Kruskal-Wallis,  $p < 0.001$  entre tots els grups cultivats a 5,5 mM de glucosa, Mann-Whitney \* $p < 0.05$  illots control i Ad-LacZ exposats a IL-1β vs tots els altres grups incubats a 5,5 mM de glucosa. Kruskal-Wallis,  $p < 0.001$  entre tots els grups cultivats a 22,2 mM de glucosa, Mann-Whitney, † $p < 0.05$  illots control i Ad-LacZ exposats a IL-1β vs tots els altres grups exposats a 22,2 mM de glucosa; §  $p < 0.05$  Ad-IL-1Ra vs tots els altres grups excepte Ad-IL-1Ra + IL-1β.

#### 4.- Expressió del gen d'IL-1 $\beta$ en els illots

Tenint en compte els resultats anteriors on havíem vist que la sobreexpressió d'IL-1Ra en els illots feia augmentar la replicació de les cèl·lules beta i que la presència d'IL-1 $\beta$  tenia un efecte tan aparent sobre la replicació d'aquestes cèl·lules, vàrem hipotetitzar que potser les cèl·lules dels illots en cultiu ja expressaven IL-1 $\beta$ . Per tal de comprovar-ho vàrem determinar l'expressió del gen de la IL-1 $\beta$  per RT-PCR a temps real d'illots cultivats durant 24h després de l'aïllament.

Tal i com havíem hipotetitzat, els illots cultivats durant 24 h expressaven 4 vegades més IL-1 $\beta$  que els illots acabats d'aïllar (Fig. 11).



**Fig. 11.- Expressió del gen d'IL-1 $\beta$**  en els illots frescos i en els cultivats durant 24h per RT-PCR a temps real utilitzant el 18S com a control endogen. Els valors estan donats com la mitjana  $\pm$  error estàndard de 4 experiments diferents.

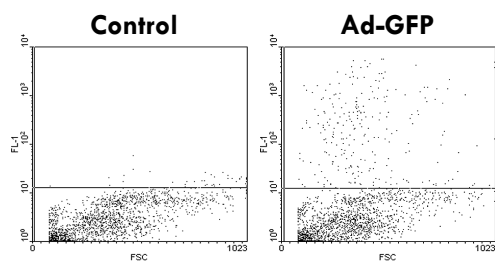
## **Estudi del paper d'IL-1 i de la sobreexpressió d'IL-1Ra en el trasplantament d'illots pancreàtics.**

Un cop demostrat que els illots infectats amb l'adenovirus que codifica per l'IL-1Ra expressaven suficient IL-1Ra com per evitar els efectes deleteris de la IL-1 $\beta$  sobre les cèl·lules beta dels illots, es va estudiar el paper de la IL-1 en la fallada del trasplantament d'illots utilitzant un model singènic. Aquest model ens permet estudiar els processos d'inflamació independent del rebuig que es donen en el trasplantament d'illots.

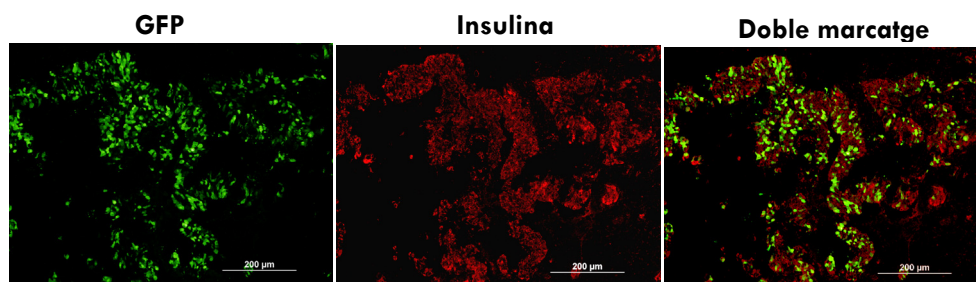
### **5.- Eficiència de la infecció**

Per tal de comprovar que obtenim els mateixos nivells d'infecció, amb  $6.25 \times 10^6$  pfu d'adenovirus, que a l'inici de l'estudi; es va tornar a determinar l'eficiència d'infecció d'illots infectats amb Ad-GFP després de 18h de cultiu. En aquest cas l'EI només es va determinar per citometria de flux a partir de les cèl·lules dispersades dels illots. Els nivells d'EI foren comparables als que havíem obtingut prèviament (~30%) (Fig. 12A). En aquest cas també es va comprovar la presència i distribució del transgen (GFP) en els empelts d'illots infectats amb Ad-GFP 3 dies després del trasplantament (Fig. 12B) i la seva colocalització amb la insulina, determinada per microscòpia confocal (Fig.12C).

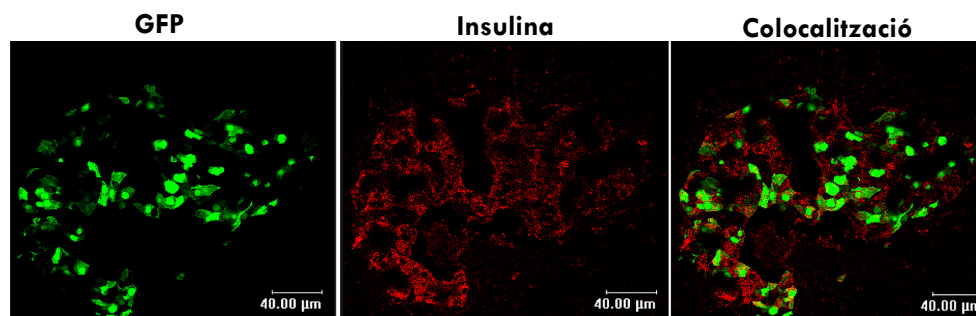
### A. Citometria de flux



### B. Microscòpia de fluorescència



### C. Microscòpia confocal

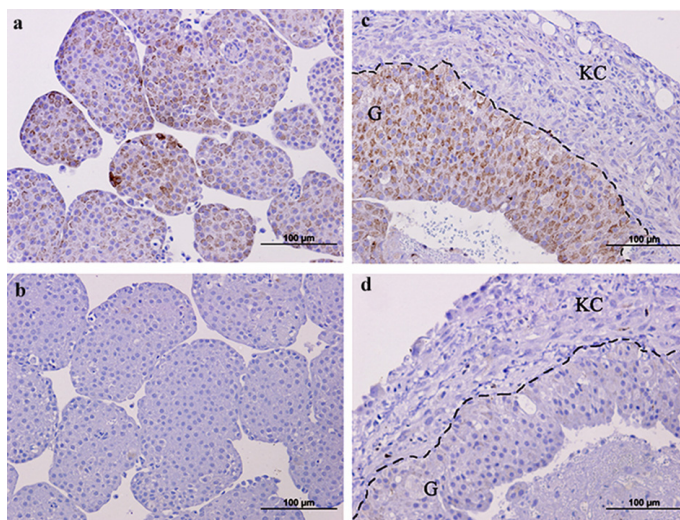


**Fig. 12.- Eficiència d'infecció.** A. Cèl·lules dispersades dels illots control i Ad-GFP analitzades per citometria de flux. FL1 és el fotomultiplicador que detecta la fluorescència verda. Micrografia d'un empelt d'illots Ad-GFP 3 dies després del trasplantament visualitzat B. per microscòpia fluorescent convencional o C. per microscòpia confocal.

## 6.- Expressió d'IL-1Ra en els illots abans i després del trasplantament.

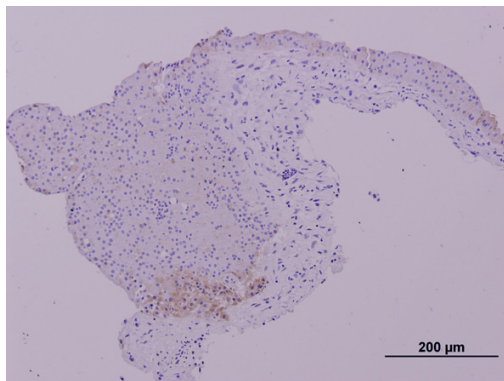
Un cop determinats els nivells d'infecció assolits per l'adenovirus en aquesta segona part de l'estudi, i la distribució de les cèl·lules positives per GFP en els illots trasplantats, es va determinar l'expressió del gen problema (IL-1Ra) en els illots abans del trasplantament, i en els empelts de 3 dies.

18h. després de la infecció, quan els illots es preparen per ser trasplantats, l'expressió d'IL-1Ra era abundant en els illots infectats amb l'adenovirus que codificava per aquesta proteïna; i tot i que els illots control presentaven alguna cèl·lula positiva per l'antagonista del receptor d'IL-1, la seva expressió era molt feble i la proporció de cèl·lules positives també era força baixa (Fig. 13). Els nivells d'expressió d'IL-1Ra continuaven sent elevats en els illots Ad-IL-1Ra, 3 dies després del trasplantament. Els empelts d'illots control presentaven algunes cèl·lules positives per IL-1Ra però, de la mateixa manera que en el cas dels illots abans de trasplantar, els nivells eren inferiors (Fig. 13).

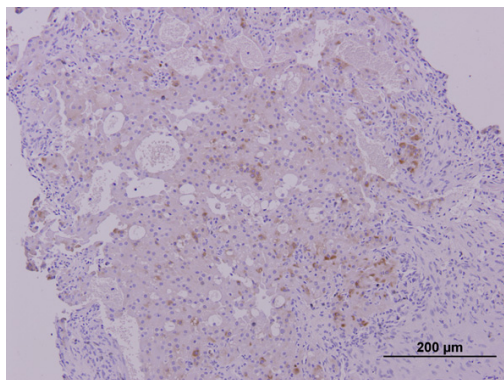


**Fig. 13.- Marcatge d'IL-1Ra en els illots abans (a,b) i després del trasplantament (c,d).** Les imatges mostren un augment significatiu de l'expressió d'IL-1Ra en els illots i empelts d'illots que sobreexpressen l'IL-1Ra (a,c) comparats amb els controls (b,d). KC: càpsula renal. G: empelt d'illots

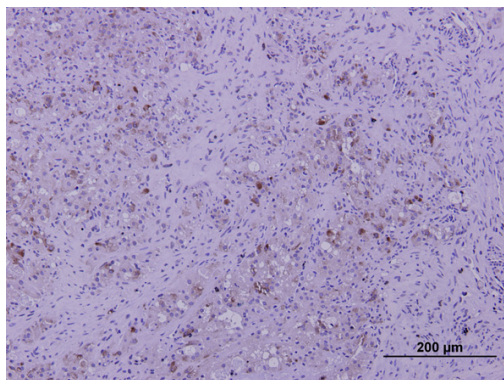
## 7.- Morfologia dels empelts



**Fig.14.- Empelt de 3 dies**



**Fig.15.- Empelt de 10 dies**



**Fig.16.- Empelt de 28 dies**

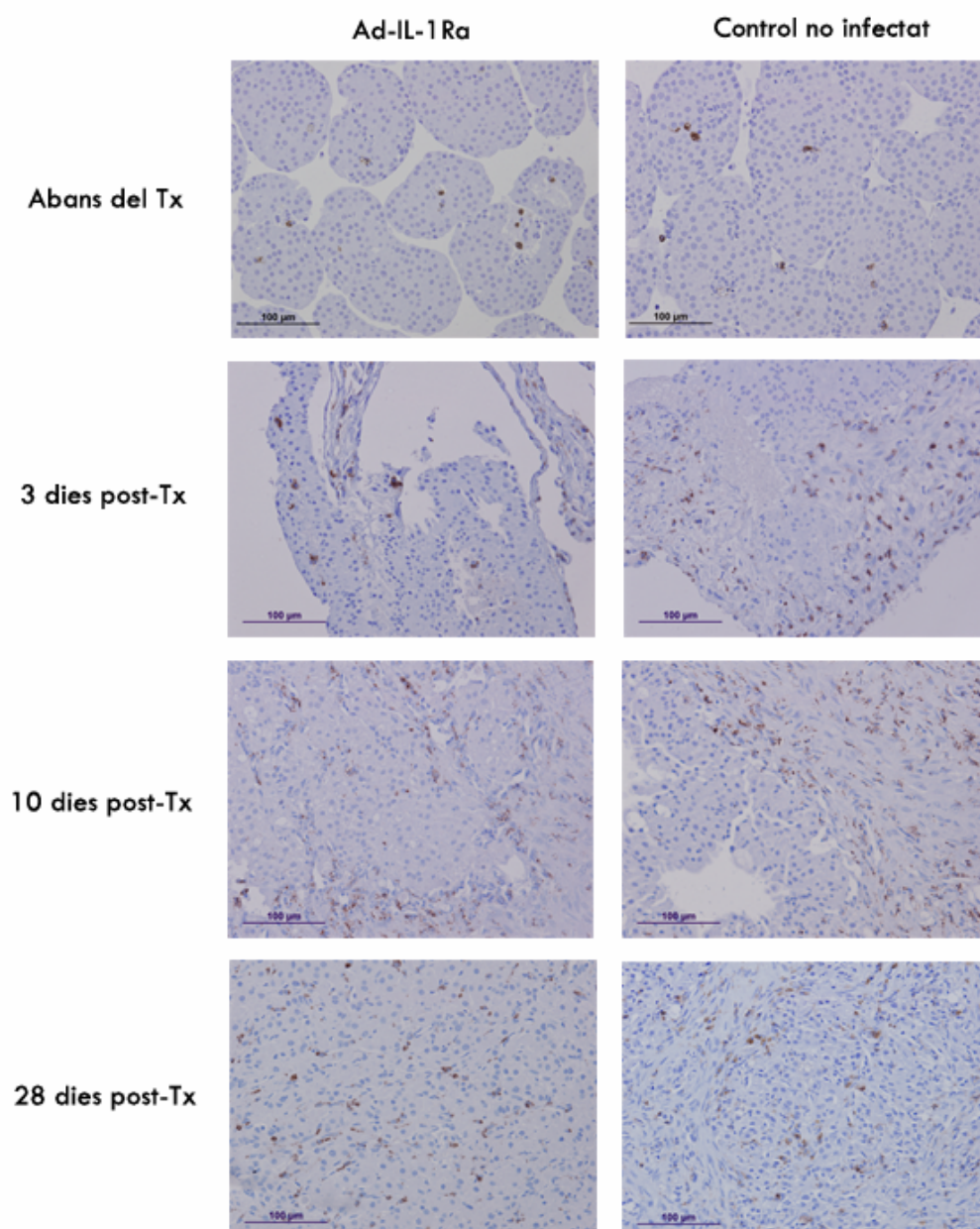
Els empelts d'illots que van ser extrets després de **3 dies** (Fig. 14) del transplantament no estaven adherits al córtex renal. A nivell microscòpic, sovint presentaven grans àrees necròtiques en mig del teixit insular, que en aquests primers dies queda compacte i molt ben diferenciat de la resta de teixits, bàsicament càpsula renal.

En el cas dels empelts de **10 dies** (Fig. 15), poden estar més adherits al córtex renal i a nivell microscòpic s'observen altres tipus cel·lulars, majoritàriament fibroblasts, inexistents en els empelts més inicials. En aquests empelts es poden veure petits vasos i la necrosi tant abundant en els empelts de 3 dies ja no és tan aparent.

Després de **28 dies** (Fig.16) del trasplantament els empelts dels animals hiperglucèmics presenten un aspecte translúcid, a diferència dels empelts d'illots dels animals normoglucèmics que són clarament opacs. A nivell microscòpic, presenten un aspecte similar als empelts de 10 dies, però en aquest cas apareixen restes de teixit provinent del córtex renal i la presència de fibroblasts és notòria en mig del teixit insular



## 8.- Distribució i abundància dels macròfags en els empelts d'illots



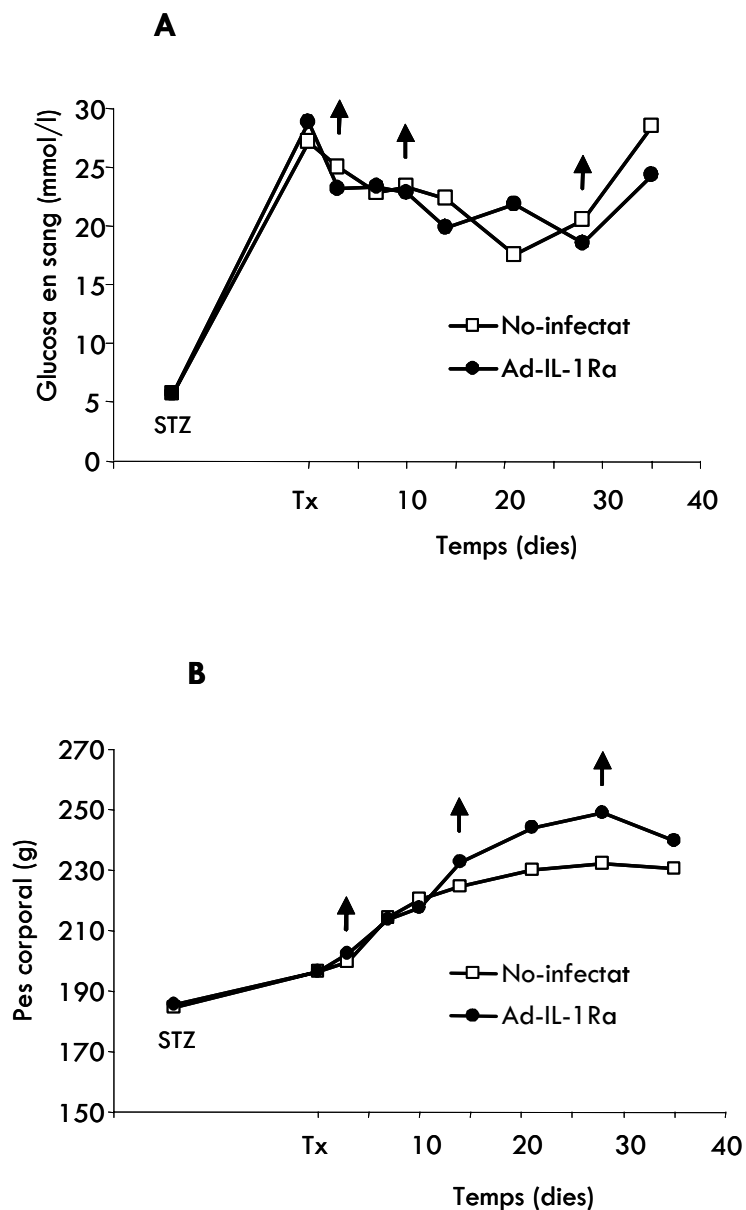
**Fig. 17.- Marcatge de CD-68 dels illots abans del trasplantament i dels empelts d'illots.** Les imatges mostren la presència de macròfags intra-illot abans del trasplantament i l'abundància i distribució d'aquests leucòcits en els empelts d'illots. (200 augments)

Els illots aïllats presentaven, tot i que en baixa proporció, macròfags intra-illot i la seva distribució i freqüència era similar en ambdós grups, control no infectats i en els Ad-IL-1Ra (Fig. 17). Després del trasplantament la infiltració de macròfags era més evident, però en cap cas es varen observar infiltrant el teixit insular. En aquests empelts no hem observat que la infecció amb adenovirus alteri l'abundància ni la distribució dels macròfags (Fig.17).

### **9.- Evolució metabòlica dels animals trasplantats amb 500 illots**

Com ja ha estat descrit al material i mètodes, en aquest estudi s'han utilitzat dos models diferents de trasplantament. El model de trasplantament de 500 illots, en el que es va voler estudiar l'efecte de la sobreexpressió d'IL-1Ra en els illots trasplantats exposats a hiperglucèmia. I el model de trasplantament de 800 illots, que es tracta d'una massa d'illots subcrítica per curar una rata diabètica, per estudiar si la sobreexpressió d'IL-1Ra podia millorar el pronòstic del trasplantament.

En el cas dels animals trasplantats amb 500 illots (n=36) tots es van mantenir hiperglucèmics fins al final de l'estudi (Fig.18), excepte un de trasplantat amb illots transfectats amb Ad-IL-1Ra, en el que es restablí la normoglucèmia. Cal remarcar que quan se'n va extreure l'empelt, l'animal esdevingué hiperglucèmic un altre cop; d'aquesta manera queda demostrat que la normalització de la glucèmia venia dels illots trasplantats i no d'una regeneració del pàncrees endogen.

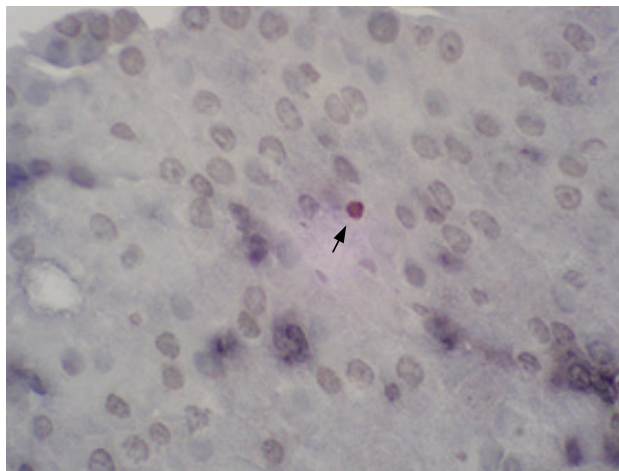


**Fig. 18.- Evolució metabòlica dels animals transplantats amb 500 illots. A** Glucèmia i **B** Pes dels animals. —□— animals transplantats amb 500 illots no infectats o amb —●— 500 illots Ad-IL-1Ra. Els valors estan donats com la mitjana de les glucèmies dels animals transplantats amb illots no infectats ( $n = 18$ ) o infectats amb Ad-IL-1Ra ( $n = 18$ ).

## 10.- Mort de les cèl·lules beta dels illots transplantats

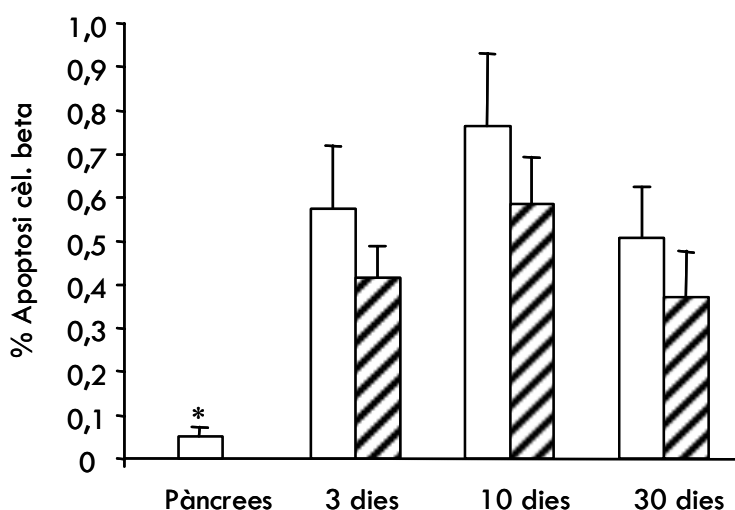
### 10.1.- Apoptosi de les cèl·lules beta dels empelts d'illots

L'apoptosi de les cèl·lules beta dels empelts d'illots es va determinar mitjançant la tècnica del TUNEL en els empelts de 3, 10 i 28 dies després del trasplantament i en 6 pàncrees de rates Lewis sanes.



**Fig. 19.-** Micrografia d'un empelt d'illots 3 dies després del trasplantament marcat pel TUNEL (marró) i per les cèl·lules endocrines insular no beta (blau-lilós) (40X). La fletxa assenyala un nucli marcat pel TUNEL que correspon a una cèl·lula beta.

L'apoptosi de les cèl·lules beta dels empelts d'illots control estava augmentada tant als 3 ( $0,57 \pm 0.15\%$ ), com als 10 ( $0.76 \pm 0.41\%$ ), com als 28 ( $0.51 \pm 0.12\%$ ) dies després del trasplantament respecte l'apoptosi basal que hi ha en el pàncrees dels animals sans ( $0.05 \pm 0.02\%$ ), com ja havia estat descrit anteriorment pel nostre grup en un model de ratolí. En el cas dels empelts d'illots que sobreexpressaven l'antagonista, els nivells d'apoptosi de les cèl·lules beta van ser un 25% més baixos que els dels empelts d'illots control, però no van assolir diferències significatives (fig.18).

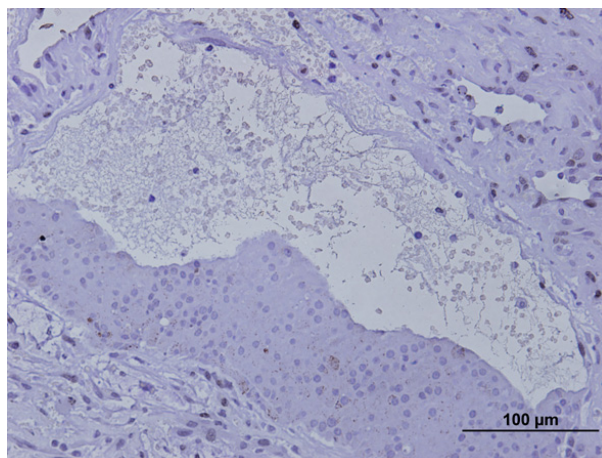


**Fig. 20.- Apoptosi, determinada per la tècnica del TUNEL, de les cèl·lules beta d'empelts d'illots singènics sotmesos a hiperglucèmia. □ empelts d'illots control, ▨ empelts d'illots IL-1Ra. Els valors estan expressats com la mitjana  $\pm$  error estàndard. \* $p < 0.05$  entre el pàncrees i la resta de grups.**

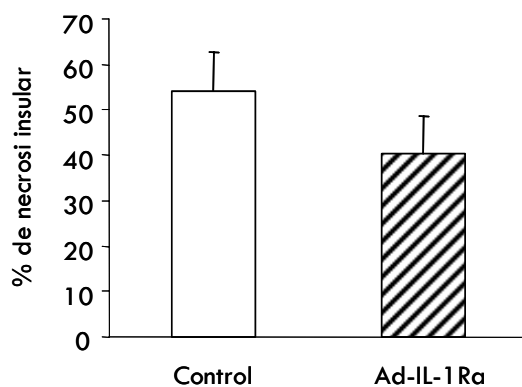
### 10.2.- Necrosi insular dels empelts d'illots

En el tercer dia després del transplantament es van detectar grans àrees necròtiques en els empelts d'illots. Cal remarcar que en aquests primers dies després del transplantament, el teixit recuperat consta bàsicament de càpsula renal i teixit insular, i que aquestes àrees es trobaven envoltades de teixit insular, així doncs, podem dir que el teixit necrosat era predominantment insular. La necrosi en els empelts d'illots transfectats amb Ad-IL-1Ra ( $40.26 \pm 8\%$ ) havia disminuït en un 25% respecte el grup control ( $54.19 \pm 8\%$ ).

A



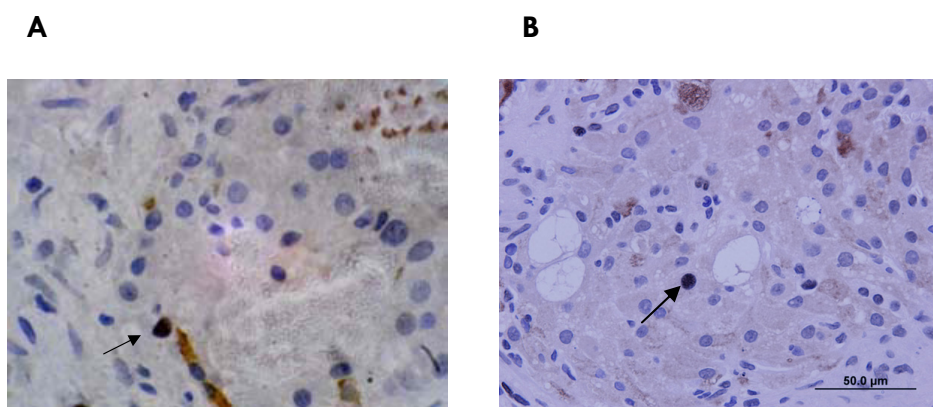
B



**Fig. 19.- Necrosi insular** en els 3 dies després del trasplantament. (A) imatge de la necrosi insular d'un empelt d'illots de 3 dies d'evolució. (B) Resultat de la quantificació de la necrosi insular per morfometria per contacte de punts, explicat en el *material i mètodes*. Els valors estan donats com la mitjana  $\pm$  error estàndard de la mitjana de 5 experiments diferents.

## 11.- Proliferació de les cèl·lules beta dels illots transplantats

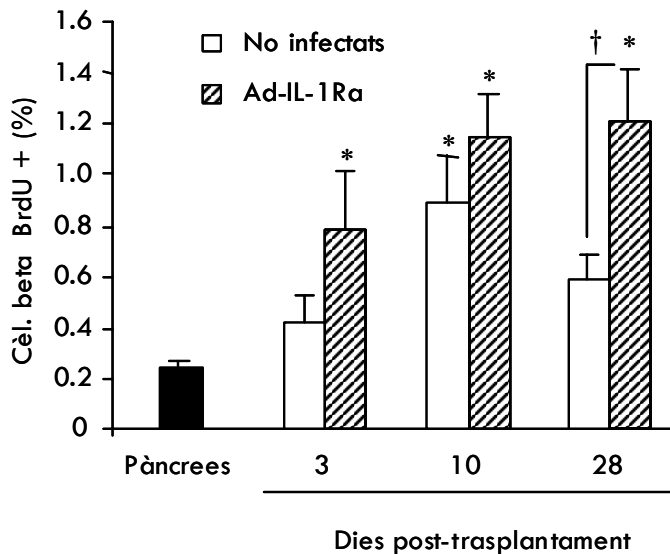
La replicació de les cèl·lules beta es va determinar en els empelts d'illots extrets al tercer, desè i vint-i-vuitè dia després del trasplantament i en pàncrees de rates sanes. Els nivells de proliferació de les cèl·lules beta dels pàncrees i dels empelts d'illots eren similars quan es varen marcar directament les cèl·lules beta utilitzant un anticòs contra la insulina, com quan es varen marcar les cèl·lules endocrines no beta mitjançant el cóctel d'anticossos contra el glucagó, la somatostatina i el polipèptid pancreàtic, demostrant la validesa del marcatge de les cèl·lules endocrines no beta per la determinació de la replicació de les cèl·lules beta.



**Fig. 20.-** Micrografia d'un empelt d'illots 10 dies després del trasplantament marcat per **BrdU** i cèl·lules endocrines insulars no beta (A) o les cèl·lules beta (B) (40X). La fletxa assenyala un nucli positiu per BrdU que correspon a una cèl·lula beta.

Les concentracions altes de glucosa estimulen la replicació de les cèl·lules beta, així doncs, esperaríem que els illots transplantats a animals hiperglucèmics, que presenten uns nivells de glucosa en sang superiors a 20 mmol/l, tinguessin la replicació de les cèl·lules beta augmentada respecte la del pàncrees.

En efecte, la replicació de les cèl·lules beta dels empelts d'illots que sobreexpressaven IL-1Ra estava significativament augmentada en el dia 3 (tinció insulina:  $0.87 \pm 0.18\%$ ; tinció cóctel:  $0.78 \pm 0.23\%$ ), 10 (tinció insulina:  $1.13 \pm 0.16\%$ ; tinció cóctel:  $1.15 \pm 0.16\%$ ) i 28 (tinció insulina:  $0.92 \pm 0.26\%$ ; tinció cóctel:  $1.22 \pm 0.2\%$ ) després del trasplantament comparada amb la del pàncrees d'animals sans (tinció insulina:  $0.37 \pm 0.08\%$ ; tinció cóctel:  $0.25 \pm 0.04\%$ ;  $p < 0.05$ ). Per contra, en el grup control, la replicació de les cèl·lules beta no estava estimulada en el dia 3 després del trasplantament (tinció insulina:  $0.38 \pm 0.07\%$ ; tinció cóctel:  $0.41 \pm 0.11\%$ ) i tot i que va augmentar en el dia 10 (tinció insulina:  $0.72 \pm 0.07\%$ ; tinció cóctel:  $0.89 \pm 0.18\%$ ;  $p < 0.01$ ), va tornar a caure després de 28 dies (tinció insulina:  $0.40 \pm 0.11\%$ ; tinció cóctel:  $0.59 \pm 0.10\%$ ), malgrat l'exposició al mateix grau d'hiperglucèmia que els empelts d'illots que sobreexpressaven IL-1Ra (Fig. 21).



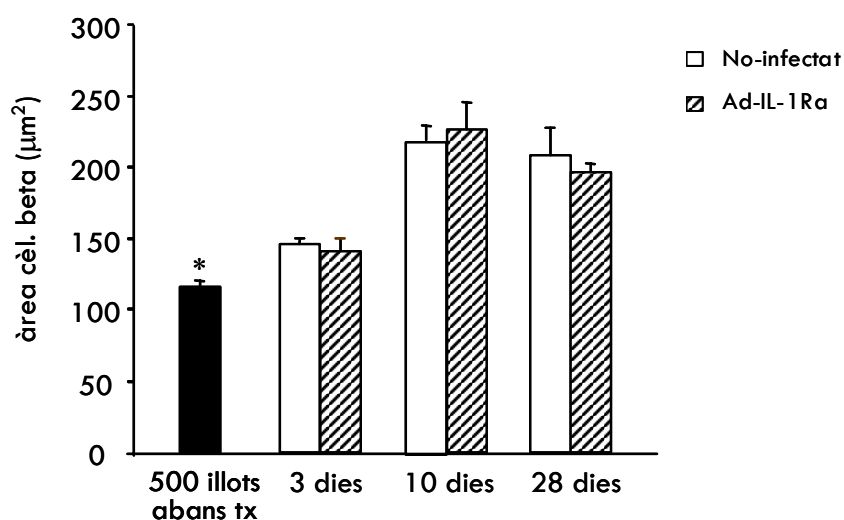
**Fig. 21.-** Replicació de les cèl·lules beta dels empelts i pàncrees mesurada per incorporació de BrdU. □ empelts d'illots control; ▨ empelts d'illots IL-1Ra. Els valors estan donats com la mitjana ± error estàndard. \* $p < 0.05$  pàncrees vs tots els grups IL-1Ra i el grup control 10 dies. † $p < 0.05$  control 28 dies vs IL-1Ra 28 dies.



## 12.- Àrea individual de les cèl·lules beta en els illots trasplantats

La mida de les cèl·lules beta es va determinar en els empelts d'illots i en els illots abans del trasplantament mitjançant un programa d'anàlisi d'imatge.

L'àrea de les cèl·lules beta va augmentar després del trasplantament (control:  $146 \pm 5 \mu\text{m}^2$ ; Ad-IL-1Ra:  $142 \pm 9 \mu\text{m}^2$ ) comparada amb la dels illots abans de trasplantar ( $116 \pm 4 \mu\text{m}^2$ ). En el dia 10 després del trasplantament l'àrea individual de les cèl·lules beta va augmentar encara més en ambdós grups (control:  $218.8 \pm 11 \mu\text{m}^2$ ; Ad-IL-1Ra:  $227 \pm 19 \mu\text{m}^2$ ), i es va mantenir augmentada en el dia 28 (control:  $209 \pm 20 \mu\text{m}^2$ , Ad-IL-1Ra:  $197 \pm 5 \mu\text{m}^2$ ) (Fig.22).

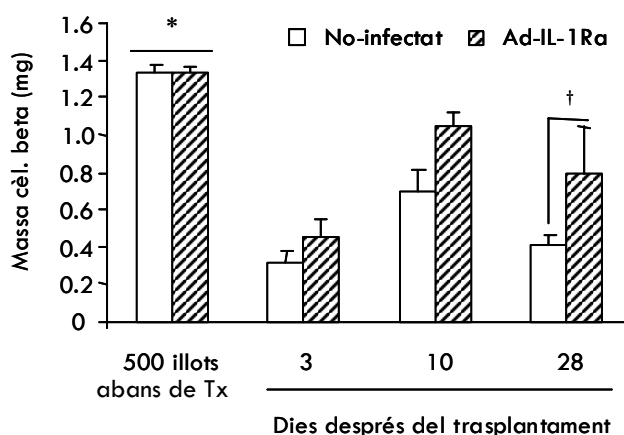


**Fig. 22.- Àrea individual de les cèl·lules beta dels illots trasplantats.** □ illots control; ▨ illots Ad-IL-1Ra. Els valors estan donats com la mitjana ± error estàndard de 5 trasplantaments. \*  $p < 0.05$  illots abans del trasplantament vs els altres grups.

### 13.- Evolució de la massa beta trasplantada

Per tal d'estudiar la repercussió que podien tenir les variacions en l'apoptosi i la replicació de les cèl·lules beta dels empelts d'illots que sobreexpressaven IL-1Ra respecte els d'illots control, es va determinar la massa beta dels empelts després de 3, 10 i 28 dies després del trasplantament i dels illots just abans del trasplantament.

La massa beta que inicialment es va trasplantar ( $1.34 \pm 0.03$  mg) estava disminuïda dràsticament en ambdós grups després de 3 dies del trasplantament (Control:  $0.32 \pm 0.06$  mg) (IL-1Ra:  $0.45 \pm 0.10$  mg) ( $p < 0.001$ ), tot i que la massa beta dels empelts d'illots que sobreexpressaven IL-1Ra era un 40% superior a la del grup control. En el cas del grup IL-1Ra, la massa beta es va recuperar en el dia 10 després del trasplantament ( $1.04 \pm 0.091$  mg;  $p < 0.01$ ) i es va mantenir en els empelts de 28 dies ( $0.8 \pm 0.24$  mg). En canvi, la massa beta del grup control va augmentar després de 10 dies del trasplantament ( $0.69 \pm 0.12$  mg), per tornar a caure en el dia 28 ( $0.41 \pm 0.05$  mg). (Fig. 23)

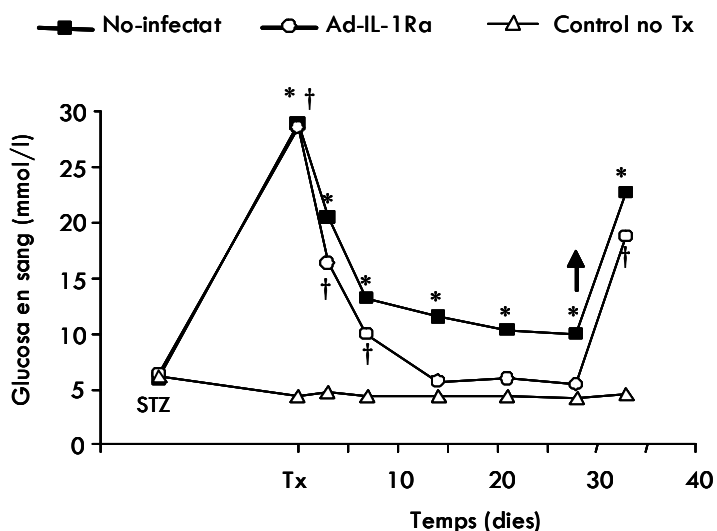


**Fig. 23.- Massa beta dels illots abans de trasplantar i dels empelts d'illots als diferents dies després del trasplantament.** □ illots control; ▨ illots IL-1Ra. Els valors estan donats com la mitjana  $\pm$  error estàndard de 5 trasplantaments. \*  $p < 0.001$  control i IL-1Ra 18h cultiu vs tots els altres grups excepte IL-1Ra 10 dies; †  $p < 0.013$  IL-1Ra 30 dies vs Control 28 dies.

#### 14.- Evolució metabòlica dels animals trasplantats amb 800 illots

Comprovats els efectes beneficiosos de la sobreexpressió d'IL-1Ra sobre la massa beta trasplantada, es van trasplantar 800 illots control o IL-1Ra a rates Lewis diabètiques per STZ. Cal remarcar que 800 illots són una massa subcrítica, i per tant s'esperava que la major part dels animals trasplantats es mantinguessin hiperglucèmics.

El 100% dels animals trasplantats amb illots que sobreexpressaven IL-1Ra restabliren la normoglucèmia 14 dies després del trasplantament. En canvi només el 40% dels animals trasplantats amb illots control varen assolir uns nivells normals de glucèmia al dia 14, i un 80% dels animals d'aquest grup van esdevenir normoglucèmics del dia 21 al 28 després del trasplantament (Fig.24).

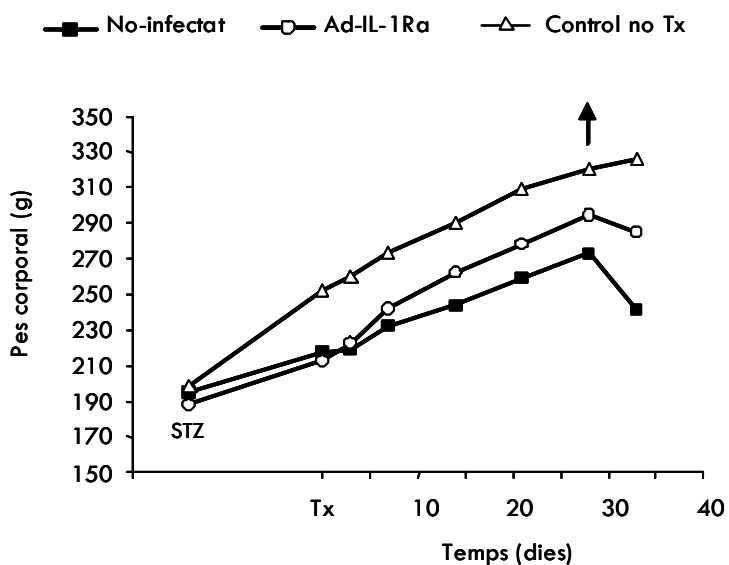


**Fig. 24.- Evolució de la glucèmia** dels animals trasplantats amb 800 illots singènics no infectats o infectats amb adenodirus que codifica per IL-1Ra. Els valors estan expressats com la mitjana de les glucèmies de 5 animals. \* $p < 0.05$  vs control no trasplantat. † $p < 0.05$  vs control no trasplantat. La fletxa indica l'extracció de l'empelt d'illots. STZ: Administració d'estreptozotocina (només en el cas dels animals trasplantats).

## Resultats

Quan es van extreure els empelts (dia 28) tots els animals van esdevenir hiperglucèmics, demostrant que la recuperació dels nivells de glucosa en sang era degut a la funció dels illots trasplantats i no a una regeneració del pàncrees endogen.

El pes dels animals va seguir un patró lògic segons l'estat metabòlic de l'animal, així doncs, els animals trasplantats amb els illots que sobreexpressaven IL-1Ra que com s'ha vist anteriorment presentaven uns nivells de glucèmia més regulats, també van evolucionar millor respecte el pes, guanyant-ne més que els animals trasplantats amb illots control (Fig.25).



**Fig. 25.- Evolució del pes** dels animals trasplantats amb 800 illots singènics no infectats o Ad-IL-1Ra. Els valors estan expressats com la mitjana dels pesos de 5 animals. La fletxa indica l'extracció de l'empelt d'illots. STZ: Administració d'estreptozotocina

**Discussió**



La diabetis mellitus tipus 1 és una malaltia autoimmunitària que consisteix en la destrucció selectiva de les cèl·lules beta pancreàtiques. Aquesta destrucció és el resultat d'un procés inflamatori, en el que els limfòcits T activats infiltraven els illots pancreàtics i juntament amb altres tipus cel·lulars secreten citocines proinflamatòries que acaben destruint les cèl·lules beta<sup>32,34</sup> Entre les citocines proinflamatòries implicades en aquest procés es troba la IL-1 $\beta$ , que és secretada majoritàriament pels macròfags activats, cèl·lules immunitàries que es troben residents, tot i que en baixa proporció, en els illots pancreàtics i estan implicats en la primera onada d'insulinitis que té lloc durant el desenvolupament de la DM1<sup>1,25,39,44</sup>.

La IL-1 $\beta$  té uns efectes clarament deleteris sobre les cèl·lules beta pancreàtiques. Els experiments "in vitro" realitzats en aquest treball, on s'han cultivat els illots en presència d'aquesta citocina, revelen un doble efecte de la IL-1 $\beta$  sobre la biologia de les cèl·lules beta. Per una banda, provoca un augment del nombre de cèl·lules que entren en apoptosi, i per una altra, inhibeix dràsticament la proliferació de les cèl·lules beta.

Els efectes de les citocines proinflamatòries IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , i IFN- $\gamma$  sobre la viabilitat de les cèl·lules beta pancreàtiques han estat extensament estudiats. Està ben acceptat que els illots de les diferents espècies (rata, ratolí i humà) presenten diferents graus de susceptibilitat a aquestes citocines, sent els més resistents els de ratolí i els més sensibles els de rata<sup>23</sup>. Eizirik i col. varen descriure que la IL-1 $\beta$  indueix apoptosi a les cèl·lules beta pancreàtiques de rata quan aquestes s'exposen a la citocina durant un mínim de 5 dies, i que l'addició d'IFN- $\gamma$  al cultiu accelera la inducció d'apoptosi sent necessàries només 48h per veure els efectes.

En el nostre estudi, l'exposició dels illots de rata a la IL-1 $\beta$  durant 48h ha resultat en un augment significatiu de l'apoptosi de les cèl·lules beta.

## Discussió

L'heterogeneïtat de la composició cel·lular dels illots, que consten no només de cèl·lules endocrines, sinó que també de cèl·lules endotelials i macròfags<sup>1</sup>, juntament amb el microambient generat a l'interior de l'illot en resposta a la citocina poden ser causes de la potenciació dels efectes deleteris de la IL-1 $\beta$  sobre les cèl·lules beta pancreàtiques en els illots sencers.

La interacció d'IL-1 $\beta$  amb el receptor tipus 1 d'IL-1 (IL-1R1) de les cèl·lules beta provoca l'expressió de diversos mediadors entre els que es troba iNOS<sup>9</sup>, la forma induïble de la sintasa d'òxid nítric. Aquest enzim catalitza l'oxidació de l'aminoàcid L-arginina per donar òxid nítric i citrulina<sup>15</sup>. Concentracions elevades d'òxid nítric en les cèl·lules beta pancreàtiques desencadenen l'activació d'un seguit de processos bioquímics, com ara la inhibició de l'enzim aconitasa del cicle de krebs, o l'activació de la poli(ADP ribosa) polimerasa (PARP) provocant una reducció dels nivells d'ATP i NAD<sup>+</sup> i induint mort cel·lular, tant per apoptosi com per necrosi<sup>14</sup>. L'òxid nítric també pot generar talls en el DNA, o activar p53 que també provoquen l'aturada del cicle cel·lular de les cèl·lules beta i l'entrada en apoptosi<sup>16</sup>.

Els nivells d'òxid nítric en l'espai intercel·lular dels illots sencers exposats a IL-1 $\beta$  podria ser sensiblement més elevat que els nivells que s'assoleixen en un cultiu de cèl·lules beta en monocapa, explicant així la diferent sensibilitat de les cèl·lules beta de rata als efectes deleteris d'IL-1 $\beta$  sobre la viabilitat.

La implicació de la IL-1 $\beta$  en el desenvolupament de la diabetis mellitus tipus 1 i en la diabetis mellitus tipus 2, ha portat a estudiar extensament els efectes de la citocina sobre les cèl·lules beta. Aquests treballs han aportat molts coneixements relacionats amb el paper de la IL-1 sobre la viabilitat i funció de les cèl·lules beta dels illots de diferents espècies. Per altra banda, el paper de la IL-1 $\beta$  sobre la proliferació de les cèl·lules beta no ha estat tan estudiat i la informació de la que disposem és limitada.



En el nostre estudi hem observat que l'exposició dels illots de rata a la IL-1 $\beta$  provoca una dràstica inhibició de la proliferació de les cèl·lules beta. Aquest efecte s'ha observat tant en els illots cultivats a baixes com a altes concentracions de glucosa, indicant que l'efecte mitogènic de la glucosa sobre les cèl·lules beta queda abolit per la presència de la citocina.

Tot i la poca informació disponible sobre els efectes d'IL-1 $\beta$  sobre la proliferació de les cèl·lules beta, existeix un altre estudi on es mostra un efecte similar al observat per nosaltres en els illots humans exposats a la citocina durant 5 dies<sup>31</sup>, suggerint que l'elevada sensibilitat de la replicació de les cèl·lules beta davant IL-1 $\beta$  deu ser comú entre ambdues espècies.

Donada la importància que té la IL-1 $\beta$  en el desenvolupament de la diabetis tipus 1 i la toxicitat que exerceix sobre les cèl·lules beta, vàrem examinar la possibilitat de bloquejar els efectes deleteris d'IL-1 $\beta$  en illots de rata mitjançant la sobreexpressió d'un antagonista natural d'IL-1. En aquest estudi hem demostrat que la sobreexpressió de l'antagonista del receptor d'IL-1 (IL-1Ra) en els illots, mitjançant un adenovirus recombinant, protegeix les cèl·lules beta de l'increment d'apoptosi i de la inhibició de la replicació induïts per IL-1 $\beta$ . Ens va semblar particularment interessant l'efecte mitogènic de la sobreexpressió de l'IL-1Ra sobre les cèl·lules beta pancreàtiques. La presència d'IL-1 $\beta$  en els illots cultivats suggereix que l'efecte mitogènic d'IL-1Ra pot venir donat pel bloqueig de l'IL-1 produïda pels macròfags que es troben infiltrant els illots. Aquesta dada revela l'elevada vulnerabilitat de les cèl·lules beta davant la presència de la citocina proinflamatòria IL-1 $\beta$ .

L'expressió de mediadors proinflamatoris en els illots pancreàtics deguda al procés d'aïllament ha estat proposada per altres autors<sup>26,53</sup> i de fet permet explicar altres efectes beneficiosos de la sobreexpressió d'IL-1Ra que s'han observat en els illots cultivats, com ara la reducció de la

producció d'òxid nítric d'illots humans que sobreexpressen IL-1Ra quan es comparen amb els nivells produïts pels illots control<sup>19</sup>.

La necessitat de nivells elevats d'IL-1Ra per desplaçar la unió de la IL-1 $\beta$  al receptor tipus 1, requereix la presència local de grans concentracions de l'antagonista. Aquesta condició es va obtenir en els illots després de la infecció amb adenovirus. En aquest estudi hem observat que després de 48h de la infecció amb  $6,25 \times 10^6$  pfu d'Ad-GFP, aproximadament el 26% de les cèl·lules beta dels illots expressaven el transgen. Amb aquesta eficiència d'infecció hem observat que els nivells d'IL-1Ra assolits en els illots infectats són suficients per protegir les cèl·lules beta dels efectes deleteris d'IL-1 $\beta$  sobre l'apoptosi i replicació, tot i l'elevada sensibilitat de les cèl·lules beta a la aquesta citocina<sup>17</sup>.

Aquests efectes beneficiosos es van assolir utilitzant una dosi d'adenovirus que no alterava la viabilitat, la funció ni la proliferació de les cèl·lules beta dels illots infectats. Degut a la controvèrsia existent entre els nivells d'infecció de les cèl·lules de l'illot que es poden assolir amb adenovirus, en aquest estudi s'han determinat els nivells d'eficiència d'infecció per dues tècniques diferents: citometria de flux per obtenir el percentatge de cèl·lules dels illots que expressaven la GFP, i immunohistoquímica per determinar el percentatge de cèl·lules beta que expressaven el transgen i la distribució de les cèl·lules infectades. En el nostre cas, a l'igual que altres grups<sup>3,4,40</sup> la major part de cèl·lules que havien estat infectades eren les de la perifèria de l'illot, i l'eficiència de la infecció fou d'aproximadament el 30%. Cal tenir en consideració que aquesta eficiència correspon a la infecció dels illots sencers, ja que els grups que treballen amb cèl·lules insulars dispersades obtenen percentatges més elevats, al voltant del 75-80%<sup>2</sup>. De totes maneres hi ha algun treball on es mostren percentatges d'infecció del 75% en illots humans sencers, però no queda ben reflectida la rigurositat del mètode utilitzat per determinar-ho.

La inhibició de la proliferació de les cèl·lules beta per part d'IL-1 $\beta$  i la protecció que confereix la sobreexpressió d'IL-1Ra sobre aquestes cèl·lules, pot ser rellevant tant en la diabetis tipus 1 i 2, com en la fallada del trasplantament d'illots. S'ha suggerit que durant el desenvolupament de la DM1, les cèl·lules beta responen davant l'amenaça que suposen les citocines pro-inflamatòries, i s'hipotetitza que davant l'atac immunològic s'engeguen mecanismes de supervivència entre els que es troba la proliferació<sup>13</sup>. Així doncs, el grau de destrucció de les cèl·lules beta, i per tant el desenvolupament de la DM1, dependrà del balanç entre el dany i mort, per una banda, i dels mecanismes de defensa i creixement de les cèl·lules beta per l'altra. La demostració de que la IL-1 $\beta$  inhibeix dràsticament la proliferació de les cèl·lules beta pancreàtiques suggereix que aquesta citocina té un doble paper en el desenvolupament de la DM1, per una banda induint mort cel·lular i per l'altra evitant la proliferació de les cèl·lules beta remanents en el pàncrees infiltrat. Els efectes beneficiosos d'IL-1Ra sobre la proliferació de les cèl·lules beta donen suport al potencial terapèutic d'aquesta citocina antiinflamatòria per la prevenció de la DM1.

Per altra banda, la massa beta està disminuïda en els pacients amb diabetis mellitus tipus 2 (DM2), i en individus que presenten intolerància a la glucosa postprandial, condició que comporta un elevat risc pel desenvolupament de DM2<sup>7</sup>. La correlació positiva existent entre la edat i la proliferació de les cèl·lules beta<sup>35</sup> suggereix que la replicació de les cèl·lules beta té un paper important en el manteniment de la massa beta, i que una reducció de la capacitat proliferativa de les cèl·lules beta podria implicar la disminució de la massa beta. Models animals de DM2 com les rates Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty (OLETF)<sup>55</sup>, o *Psammomys obesus*<sup>12</sup> presenten uns nivells de replicació de les cèl·lules beta insuficients per mantenir la massa beta. A més en el cas de *Psammomys obesus* s'ha observat un augment de l'expressió d'IL-1 en els illots dels animals que havien desenvolupat DM2<sup>31</sup>. En aquest mateix estudi també es va identificar

## Discussió

l'expressió d'aquesta citocina en els illots d'individus humans que havien patit DM2, donant suport al paper d'IL-1 $\beta$  en l'alteració de la proliferació de les cèl·lules beta.

Aquests resultats han estat contradits molt recentment per la publicació d'un treball on no s'observen canvis entre l'expressió d'IL-1 d'illots provinents de persones sanes i de diabètics tipus 2<sup>54</sup>. La naturalesa de la discordança entre els resultats obtinguts a partir d'ambdós treballs no ha estat esbrinada, però la variabilitat entre els protocols utilitzats podria ser una de les possibles causes, ja que en el primer estudi la identificació d'IL-1 $\beta$  en els illots dels individus amb DM2 s'havia fet per immunohistoquímica sobre porcions de pàncrees i en el segon estudi s'han determinat els nivells d'ARNm d'IL-1 $\beta$  i s'ha fet a partir d'illots aïllats. Actualment no podem assegurar que els resultats haguessin de ser comparables, ja que per una banda la detecció de la citocina s'ha fet a diferents nivells desestimant la vida mitja del ARNm i de la proteïna, i per una altra existeix la possibilitat de que el procés d'aïllament dels illots pugui alterar el patró d'expressió d'IL-1 $\beta$ . S'ha de tenir en compte que només el procés d'aïllament i purificació dels illots pot durar entre 6 i 8 hores i el teixit pancreàtic està exposat a diferents agents amb un cert grau de toxicitat. El temps d'isquèmia calenta i freda al que està sotmès el pàncrees abans de començar la digestió de l'òrgan també pot alterar el patró d'expressió gènica dels illots. De fet, un treball publicat per Contreras i col·laboradors<sup>8</sup> mostrava la importància de la causa de mort del donant de pàncrees pel que fa a l'expressió d'IL-1 $\beta$  en els illots, ja que els illots dels pàncrees dels individus amb un temps d'isquèmia cerebral superior a 2 hores presentaven un augment de l'expressió del gen d'IL-1 $\beta$  en el pàncrees. En resum, podem dir que seran necessaris nous estudis per entendre el paper d'IL-1 $\beta$  en el desenvolupament i progressió de la DM2.

El trasplantament d'illots pancreàtics és una teràpia emergent pel tractament de la diabetis mellitus tipus 1. Tot i mostrar diversos avantatges respecte el tractament amb insulina o el trasplantament de pàncrees sencer, presenta certes limitacions. Una de les més importants és l'escassetat de teixit insular disponible per trasplantar. Aquest problema s'agreuja amb la pèrdua de teixit cel·lular beta que té lloc durant els primers dies després del trasplantament i s'ha considerat un tema d'especial interès al qual s'hi han dedicat recursos i esforços.

Al llarg de les últimes dècades s'han fet diversos estudis per conèixer millor l'evolució de la massa beta, tant en el pàncrees com en els empelts d'illots pancreàtics. Pel que fa a aquest últim, estudis de l'evolució de la massa beta després del trasplantament d'illots han demostrat que en condicions òptimes de trasplantament, model singènic on no hi ha rebuig, hi ha una reducció de més del 50% de la massa beta inicialment trasplantada durant els primers dies després del trasplantament<sup>5</sup>. Aquesta disminució de la massa beta coincideix amb un augment significatiu de l'apoptosi i necrosi de les cèl·lules beta de l'empelt. A més, estudis d'expressió gènica han mostrat que en els primers dies després del trasplantament hi ha un augment de l'expressió de citocines proinflamatòries entre les que es troba IL-1 $\beta$ <sup>36,50</sup>. Tenint en compte la vulnerabilitat de les cèl·lules beta davant els efectes deleteris de la IL-1 $\beta$ , vàrem hipotetitzar que aquesta citocina podria estar implicada en la destrucció de les cèl·lules beta després del trasplantament; i que la sobreexpressió de l'antagonista natural de la IL-1, l'IL-1Ra, aconseguiria optimitzar el trasplantament d'illots.

En aquest estudi hem observat que la sobreexpressió de l'IL-1Ra en els illots trasplantats resulta en un augment de la proliferació de les cèl·lules beta, un increment de la massa beta i una millora del pronòstic de l'empelt. Per altra banda, la mort cel·lular (tant apoptosi com necrosi) induïda pel procés del trasplantament és parcialment inhibida per la sobreexpressió de l'antagonista. El grau d'hipertròfia de les cèl·lules beta, que augmenta

després del trasplantament, no es veu afectat per la sobreexpressió de l'IL-1Ra.

Els illots pancreàtics són particularment vulnerables al procés del trasplantament. L'estrès rebut durant la fase d'aïllament es magnifica després del trasplantament<sup>37,42,50</sup>. Just després de l'aïllament, els illots pancreàtics expressen una sèrie de citocines proinflamatòries, quimioquines i altres mediadors proinflamatoris que poden tenir efectes tòxics sobre les cèl·lules beta, i a més, poden estimular la resposta inflamatòria després del trasplantament.

En aquest estudi hem observat que en el dia 3 després del trasplantament d'illots hi ha un augment significatiu de cèl·lules beta apoptòtiques en els empelts. El bloqueig selectiu de l'acció d'IL-1, mitjançant la sobreexpressió d'IL-1Ra en els illots, protegeix parcialment les cèl·lules beta de l'apoptosi induïda pel procés del trasplantament. Aquest resultat indica que la IL-1 té un paper important en la destrucció de les cèl·lules beta durant el període inicial després del trasplantament, i que comparteix protagonisme amb altres factors inductors d'apoptosi presents en aquest escenari.

Com s'ha comentat anteriorment, l'aïllament dels illots pancreàtics és un procés agressiu que comporta la inducció d'estrès a les cèl·lules insulars. La separació dels illots de la seva matriu extracel·lular implica el trencament d'unions intercel·lulars importants per la supervivència de les cèl·lules; la mort cel·lular induïda per aquesta situació és coneguda amb el nom d'anoikis<sup>51</sup>. Estudis realitzats amb illots cultivats mostren que, per una banda, els illots cultivats en suspensió presenten uns nivells elevats d'apoptosi<sup>38</sup> i que la utilització de matrius de laminina V en el cultiu milloren la supervivència i funció de les cèl·lules de l'illot<sup>20,43</sup>. Aquestes matrius inicien diferents vies de transducció del senyal que activen proteïnes com AKT, ERK, FAK o NFκB<sup>20</sup> que promouen la supervivència, propagació i

funció de les cèl·lules beta. Així doncs, en els illots aïllats manca aquesta senyalització i s'inicien senyals pro-apoptòtics que podrien estar implicats en l'augment d'apoptosi detectada en els empelts d'illots de 3 dies. Per altra banda, la hipòxia a la que estan sotmesos els illots durant els primers dies després del trasplantament, quan encara no estan vascularitzats, juntament amb el propi trauma del trasplantament també estarien jugant un paper important en l'increment d'apoptosi de les cèl·lules beta trasplantades<sup>21,46</sup>.

En el procés inflamatori inespecífic que té lloc immediatament després del trasplantament d'illots intervien diversos mediadors proinflamatoris. Tot i que la IL-1 té un paper rellevant en la destrucció de les cèl·lules beta trasplantades, els mediadors proinflamatoris IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS, etc. presents en els empelts d'illots dels primers dies després del trasplantament<sup>36</sup> i que són tòxics per les cèl·lules beta, també podrien estar implicats en la destrucció de les cèl·lules beta durant aquests primers dies.

En el nostre estudi també hem estudiat l'evolució de l'apoptosi de les cèl·lules beta dels illots trasplantats a més llarg termini. Durant aquest període els nivells d'apoptosi de les cèl·lules beta continuen estant augmentats, i la protecció conferida per la sobreexpressió de l'IL-1Ra és també parcial. Els factors causants d'aquest increment d'apoptosi, però, són diferents als que intervien en els empelts del dia 3, ja que la hipòxia i anoikis no haurien de tenir el mateix paper rellevant que poden tenir durant els primers dies després del trasplantament; en canvi els empelts de més llarga evolució han estat sotmesos a un altre tipus d'estrès, la hiperglucèmia crònica.

Els efectes negatius de la hiperglucèmia crònica són ben coneguts, la formació de productes glucosilats<sup>48</sup>, l'augment de la producció d'espècies reactives d'oxigen<sup>22</sup>, i les modificacions proteiques per part de la *O*-linked monosaccharide N-acetylglucosamine (*O*-Glc-Nac)<sup>28</sup> es consideren possibles mediadors del dany sobre les cèl·lules beta. El baix contingut d'enzims antioxidants en les cèl·lules beta, les fan particularment sensibles als efectes

tòxics de les espècies reactives d'oxigen. Existeixen estudis que reforcen aquesta hipòtesi, on els efectes deleteris de la glucosa sobre la síntesi d'insulina s'eviten mitjançant l'addició d'antioxidants al medi de cultiu<sup>22,33,48,49</sup>. Per altra banda, també s'ha observat que l'exposició de les cèl·lules beta a elevades concentracions de glucosa de manera sostinguda estimula l'expressió del receptor de Fas en les cèl·lules beta, i l'activació de les caspases 3 i 8<sup>31</sup>. En aquest fenomen estaria implicada la regulació negativa de FLIP (inhibidor de la caspasa 8), que faria d'interruptor entre l'estimulació de la proliferació de les cèl·lules beta exposades a altes concentracions de glucosa, on s'observa un augment de FLIP, i l'augment d'apoptosi quan aquesta exposició és prolongada<sup>29</sup>, que coincideix amb una caiguda dels nivells d'aquesta proteïna.

També s'ha demostrat la toxicitat de la hiperglucèmia crònica mitjançant estudis de trasplantament d'illots singènics, on s'ha observat un increment d'apoptosi de les cèl·lules beta dels illots exposats a hiperglucèmia crònica respecte els illots trasplantats a receptors normoglicèmics<sup>5</sup>.

Finalment, els primers indicis relacionant la hiperglucèmia i la citocina proinflamatòria IL-1 $\beta$  varen aparèixer amb la publicació del treball de *Maedler i col.*<sup>30</sup> on mostraven estudis histològics de pàncrees d'individus que havien sofert DM2 en els que s'observava un augment de l'expressió d'IL-1 $\beta$  en les cèl·lules beta dels illots. En aquest mateix treball, havien obtingut resultats similars utilitzant pàncrees de *Psammomys Obesus*, model animal de DM2, que després d'haver desenvolupat la malaltia, presentaven un augment de l'expressió d'IL-1 $\beta$  en els illots<sup>30</sup>. A més, aquest mateix grup ha mostrat que l'exposició dels illots humans a concentracions elevades de glucosa *in vitro* estimula l'expressió i secreció d'IL-1 $\beta$ .

Els nostres resultats suggereixen que l'apoptosi de les cèl·lules beta observada en els empelts d'illots exposats a hiperglucèmia crònica pot ser



en part provocada per la IL-1, ja que la sobreexpressió d'IL-1Ra redueix parcialment l'apoptosi en aquests empelts; però que hi ha altres factors, com la hiperglucèmia crònica *per se*, que indueixen apoptosi de les cèl·lules beta a través d'una via independent d'IL-1.

Els nivells de replicació de les cèl·lules beta adultes són particularment baixos i diferents entre els illots de diferents espècies. En el cas de les cèl·lules beta de pàncrees de rates adultes, els nivells de proliferació es mouen entre el 0.6 – 1%. La taxa proliferativa, però, es manté al llarg de la vida, fins i tot en les rates d'edat<sup>35</sup>, i pot variar en funció de la demanda metabòlica de l'individu. La replicació de les cèl·lules beta augmenta significativament després d'una pancreatectomia parcial<sup>41</sup>, o després d'una infusió continuada de glucosa<sup>47</sup>, degut a l'increment del requeriment d'insulina per mantenir la normoglucèmia.

En el nostre estudi hem observat que en el dia 3 després del trasplantament, quan els illots estan exposats a hiperglucèmia, la taxa proliferativa de les cèl·lules beta trasplantades és similar a la que s'observa en el pàncrees de les rates sanes. Aquest resultat indica que el procés del trasplantament altera la capacitat proliferativa de les cèl·lules beta en resposta a concentracions elevades de glucosa. Tot i la multitud de factors que poden estar bloquejant l'estímul mitogènic de la glucosa sobre les cèl·lules beta, podem dir que la IL-1 té un paper important, ja que la sobreexpressió de l'antagonista d'aquesta citocina en els illots trasplantats resulta en un augment de la proliferació de les cèl·lules beta trasplantades.

L'estudi de l'evolució dels nivells de proliferació de les cèl·lules beta dels illots trasplantats a diferents temps, ens ha permès detectar que en el dia 10 després del trasplantament existeix un augment de la replicació de les cèl·lules beta que torna a disminuir significativament en els empelts del dia 28. Els estudis d'expressió gènica realitzats en els empelts d'illots

mostren que l'augment d'expressió de citocines proinflamatòries que té lloc en el primer dia després del trasplantament disminueix paulatinament en els dies 3 i 7<sup>36,37</sup>. Aquesta reducció dels nivells de citocines proinflamatòries en els empelts d'evolució més llarga podria explicar l'augment de la replicació de les cèl·lules beta dels empelts de 10 dies. D'acord amb aquesta hipòtesi, hem observat que la sobreexpressió de l'IL-1Ra no modifica la taxa proliferativa de les cèl·lules beta en els empelts de 10 dies d'evolució després del trasplantament.

Els nivells de proliferació de les cèl·lules beta dels empelts d'illots control de 28 dies d'evolució tornen a caure respecte els observats en el dia 10. Aquest resultat concorda amb estudis previs realitzats en diferents models animals on s'observava una limitació de la replicació de les cèl·lules beta dels illots exposats a hiperglucèmia crònica<sup>5,27</sup>. També en estudis *in vitro* s'ha observat una limitació de la proliferació de les cèl·lules beta dels illots exposats de manera sostinguda a concentracions elevades de glucosa, i s'ha relacionat amb la regulació negativa de FLIP<sup>29</sup>, i l'augment de l'expressió de p53 i p21<sup>24</sup>. Aquests estudis indiquen que existeix una estreta relació entre l'apoptosi induïda per les dosis altes de glucosa i la limitació de la replicació de les cèl·lules beta exposades a aquest estímul.

La mida individual de les cèl·lules beta és un altre paràmetre que influeix en el balanç de la massa beta. Hi ha diversos treballs que mostren una hipertròfia de les cèl·lules beta quan aquestes estan exposades a concentracions elevades de glucosa<sup>52</sup>. Els mecanismes intracel·lulars implicats en aquest fenomen no són ben coneguts. Hi ha algunes dades que suggereixen que els factors de transcripció p70s6k i 4EBP, implicats en l'increment de síntesi proteica prèvia a la divisió cel·lular, podrien estar relacionats amb la hipertròfia cel·lular<sup>45</sup>. Aquests dos factors de transcripció són activats per mTOR, que es troba per sota de PI3K i AKT en la cascada

de senyalització de la insulina i els IGFs, i també pot ser activat per les MAPK. Estudis realitzats pel grup de l'investigador C. Rhodes indiquen que les concentracions elevades de glucosa provoquen l'activació de les MAPK<sup>6</sup> en les cèl·lules beta, suggerint que aquestes quinases podrien acabar activant mTOR i aquest activaria p70s6k i 4EBP. D'aquesta manera es podria explicar la hipertròfia de les cèl·lules beta estimulada per concentracions altes de glucosa.

En el nostre estudi hem observat que hi ha un augment de la mida de les cèl·lules beta dels illots després del trasplantament, que és més important en els empelts d'evolució mitja, 10 dies, i que es manté en els empelts de més llarga durada, 28 dies després del trasplantament. La sobreexpressió de l'IL-1Ra no altera els nivells d'hipertròfia cel·lular en cap del temps estudiats, suggerint que la citocina proinflamatòria IL-1 no afecta directament aquest paràmetre.

Tant la hipertròfia, com l'apoptosi, com la replicació de les cèl·lules beta dels illots regulen l'evolució de la massa beta després del trasplantament. La determinació de la massa beta, ens dóna una visió global de la repercussió i importància que representen la mort cel·lular, la proliferació i la hipertròfia sobre la massa total de cèl·lules beta, i per tant la seva influència en el destí de l'empelt. En aquest estudi mostrem que més del 60% de la massa beta inicialment trasplantada es perd al cap de 3 dies del trasplantament d'illots.

Durant el període inicial després del trasplantament, els illots són extremadament vulnerables<sup>5,10</sup>, i s'observa un augment significatiu de l'apoptosi de les cèl·lules beta, que juntament amb el 40% de necrosi insular que s'ha detectat en els empelts de 3 dies resulten en una destrucció massiva del teixit insular trasplantat. Per altra banda, la limitació dels processos regeneratius del teixit beta que s'observa en els empelts del dia

3 després del trasplantament, contribueixen a la caiguda de la massa beta trasplantada durant aquest primer període.

La sobreexpressió d'IL-1Ra en els illots trasplantats va reduir la pèrdua inicial de la massa beta en un 20%. Aquest fou el resultat de l'augment de la replicació de les cèl·lules beta dels empelts d'illots que sobreexpressaven l'antagonista del receptor d'IL-1, i de la protecció parcial, conferida per IL-1Ra, en front l'apoptosi (reducció d'un 25%) i la necrosi (reducció d'un 20%) observades en els primers dies després del trasplantament.

Durant aquest període inicial la necrosi insular i l'apoptosi de les cèl·lules beta, fan decantar la balança cap a la pèrdua de teixit beta. Aquest desequilibri no és suficientment compensat per l'augment de la proliferació de les cèl·lules beta que contribueix a la regeneració del teixit beta en els empelts d'illots Ad-IL-1Ra.

Deu dies després del trasplantament s'observa una recuperació de la massa beta en els empelts que sobreexpressen IL-1Ra. Aquest augment de la massa beta s'explica per l'augment de proliferació de les cèl·lules beta, la hipertròfia de les cèl·lules beta i la desaparició de les grans àrees de teixit insular necrosat.

En aquest estudi hem observat que l'evolució de la massa beta trasplantada segueix el mateix patró que mostren els nivells de replicació de les cèl·lules beta en els empelts d'illots, ja que l'augment de proliferació observat en els empelts del dia 10 concorda amb la recuperació de la massa beta. En canvi, en els empelts exposats a hiperglucèmia crònica (28 dies), quan els nivells de replicació cauen en el cas dels empelts d'illots control, la massa beta torna a patir una davallada important. Els empelts d'illots de 28 dies d'evolució que sobreexpressen IL-1Ra mantenen la massa beta, concordant amb el manteniment de la taxa replicativa de les cèl·lules beta en aquests empelts.

El conjunt d'efectes beneficiosos de la sobreexpressió d'IL-1Ra sobre les cèl·lules beta trasplantades, ens ha permès reduir el nombre d'illots necessaris per restablir la normoglucèmia dels animals diabètics. L'increment de la demanda de teixit insular per trasplantar, i la poca disponibilitat d'òrgans són dues limitacions importants per l'èxit del trasplantament d'illots com a teràpia per la curació de la diabetis. En aquest estudi, nosaltres, presentem una estratègia de teràpia gènica que ens ha permès disminuir el nombre d'illots necessaris per recuperar la normoglucèmia dels animals trasplantats. Això s'ha aconseguit reduint parcialment la mort cel·lular i augmentant la proliferació de les cèl·lules beta preservant la massa beta inicialment trasplantada.

Ja fa més d'una dècada que es va aprovar el primer assaig clínic d'inserció d'un gen exogen en les cèl·lules d'éssers humans. La teràpia gènica va aixecar moltes expectatives i es va considerar com a tractament revolucionari que permetria curar gran varietat de malalties on la causa d'aquestes era la mutació o deleció d'un gen concret. Des de finals de la dècada dels 80 fins l'any 1999 més de 3000 pacients havien estat tractats amb aquesta teràpia emergent, però el desconeixement d'algunes de les limitacions de la tècnica, com ara la resposta immunològica, o la regulació gènica, varen fer fracassar alguns dels tractaments que ja es trobaven en fase clínica i posaren en dubte la utilitat de la teràpia gènica pel tractament de malalties en éssers humans. Concretament, el setembre de 1999 la percepció d'utilitzar vectors adenovirals per teràpia gènica va canviar, quan un pacient al que se li havien administrat dosis elevades d'adenovirus via artèria hepàtica va sucumbir a la reacció immunològica que va generar el virus. Òbviament, aquest fet va despertar dubtes en quant a la utilització d'aquests tipus de vectors per teràpia gènica, però per altra banda també va generar un increment en la voluntat d'entendre millor la raó d'aquesta toxicitat derivada de l'administració de l'adenovirus. Actualment no hi ha cap dubte de que no existeix el vector ideal, però es

coneixen millor les avantatges i limitacions de cadascun. En el cas dels adenovirus sabem que no són adequats per totes les aplicacions, però les avantatges que presenta davant els altres vectors de què disposem actualment com ara la bona eficiència amb què infecta diversos tipus cel·lulars, tant quiescents com en divisió, els fan òptims per certes aplicacions.

Les cèl·lules beta pancreàtiques són un tipus cel·lular altament diferenciat amb una taxa de proliferació molt baixa (0.4-2% depenent de l'espècie) que condiciona l'elecció del vector d'expressió a utilitzar per dur a terme teràpia gènica. Aquests últims anys, l'ús d'adenovirus com a vector d'expressió en les cèl·lules beta ha estat extensament aplicat, tant en estudis *in vitro*, com *in vivo* en animals d'experimentació. Dades de la literatura recolzen l'absència d'infiltració linfocitària en els empelts d'illots infectats amb adenovirus <sup>18</sup>. De la mateixa manera, en el nostre estudi tampoc hem observat infiltració linfocitària ni augment de la presència de macròfags en cap dels empelts d'illots dels diferents temps estudiats, suggerint que la càrrega viral i el procés d'infecció *ex vivo* utilitzats en aquest treball no provoquen una resposta immunològica que portaria a la fallada del trasplantament. L'expressió transitòria del gen exogen que s'obté amb aquests vectors és adequada pel tipus d'experiments que s'han realitzat en aquest treball, ja que existeixen estudis on es demostra que els illots infectats amb adenovirus mantenen l'expressió del transgen i de proteïnes víriques fins a 20 setmanes després del trasplantament<sup>40</sup>. De fet, la localització episòmica del DNA exogen que s'obté amb la infecció amb adenovirus evita el risc de possibles alteracions en l'expressió de gens de la cèl·lula diana degudes a la inserció del DNA exogen, al que ens exposem amb l'ús d'altres vectors virals que integren aleatòriament el seu genoma al de la cèl·lula hoste.

Amb aquest estudi hem demostrat que un 26% de les cèl·lules de l'illot infectades és suficient per antagonitzar els efectes deleteris d'IL-1 tant *in vitro* com *in vivo*. Cal tenir en consideració que l'IL-1Ra és secretat i té una acció paracrina sobre les cèl·lules del voltant, la qual cosa amplifica el seu efecte. D'aquesta manera s'incrementa de manera local la relació IL-1Ra/IL-1 protegint les cèl·lules beta trasplantades dels efectes deleteris d'IL-1.

L'estudi dels processos implicats en la destrucció de les cèl·lules beta trasplantades és complicat a causa de la multiplicitat de factors que intervenen. En aquest treball hem observat que només amb el bloqueig de l'acció de la citocina proinflamatòria IL-1 es millora el pronòstic del trasplantament degut, majoritàriament, a la regeneració de les cèl·lules beta trasplantades. L'efecte beneficiós d'IL-1Ra sobre el trasplantament d'illots pancreàtics s'afegeix al que podria tenir sobre la DM1 i la DM2, donant suport al potencial terapèutic d'IL-1Ra. De fet han estat presentat molt recentment els resultats d'un assaig clínic d'IL-1Ra en pacients amb DM2, on es mostra una millora de l'estat metabòlic dels individus<sup>11</sup>.





1. Arnush,M., Scarim,A.L., Heitmeier,M.R., Kelly,C.B. & Corbett,J.A. Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes. *J. Immunol.* **160**, 2684-2691 (1998).
2. Barbu,A.R., Akusjarvi,G. & Welsh,N. Adenoviral-induced islet cell cytotoxicity is not counteracted by Bcl-2 overexpression. *Mol. Med* **8**, 733-741 (2002).
3. Becker,T.C., BeltrandelRio,H., Noel,R.J., Johnson,J.H. & Newgard,C.B. Overexpression of hexokinase I in isolated islets of Langerhans via recombinant adenovirus. Enhancement of glucose metabolism and insulin secretion at basal but not stimulatory glucose levels. *J. Biol. Chem.* **269**, 21234-21238 (1994).
4. Benhamou,P.Y. *et al.* Adenovirus-mediated catalase gene transfer reduces oxidant stress in human, porcine and rat pancreatic islets. *Diabetologia* **41**, 1093-1100 (1998).
5. Biarnes,M. *et al.* Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes* **51**, 66-72 (2002).
6. Briaud,I., Lingohr,M.K., Dickson,L.M., Wrede,C.E. & Rhodes,C.J. Differential activation mechanisms of Erk-1/2 and p70(S6K) by glucose in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **52**, 974-983 (2003).
7. Butler,A.E. *et al.* Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* **52**, 102-110 (2003).
8. Contreras,J.L. *et al.* Brain death significantly reduces isolated pancreatic islet yields and functionality in vitro and in vivo after transplantation in rats. *Diabetes* **52**, 2935-2942 (2003).
9. Corbett,J.A. & McDaniel,M.L. Intraislet release of interleukin 1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthase. *J. Exp. Med* **181**, 559-568 (1995).
10. Davalli,A.M. *et al.* Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period. Dynamic changes in structure and function. *Diabetes* **45**, 1161-1167 (1996).
11. Donath,M.Y., Faulenbach,M., Larsen,C.M., Vaag A. & Mandrup-Poulsen,T. Treatment with interleukin-1 receptor antagonist improves glycaemic control and  $\alpha$ -cell function in patients with type 2 diabetes mellitus. 42nd EASD annual meeting. Abstract available on-line at [www.easd.org](http://www.easd.org) . 2006.
12. Donath,M.Y., Gross,D.J., Cerasi,E. & Kaiser,N. Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* **48**, 738-744 (1999).

## Bibliografia discussió

13. Eizirik,D.L. & Darville,M.I. beta-cell apoptosis and defense mechanisms: lessons from type 1 diabetes. *Diabetes* **50 Suppl 1**, S64-S69 (2001).
14. Eizirik,D.L., Flodstrom,M., Karlsten,A.E. & Welsh,N. The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. *Diabetologia* **39**, 875-890 (1996).
15. Eizirik,D.L. & Leijerstam,F. The inducible form of nitric oxide synthase (iNOS) in insulin-producing cells. *Diabete Metab* **20**, 116-122 (1994).
16. Eizirik,D.L. & Mandrup-Poulsen,T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* **44**, 2115-2133 (2001).
17. Eizirik,D.L. *et al.* Cytokines suppress human islet function irrespective of their effects on nitric oxide generation. *J. Clin. Invest* **93**, 1968-1974 (1994).
18. Garcia-Ocana,A. *et al.* Adenovirus-mediated hepatocyte growth factor expression in mouse islets improves pancreatic islet transplant performance and reduces beta cell death. *J. Biol. Chem.* **278**, 343-351 (2003).
19. Giannoukakis,N. *et al.* Adenoviral gene transfer of the interleukin-1 receptor antagonist protein to human islets prevents IL-1beta-induced beta-cell impairment and activation of islet cell apoptosis in vitro. *Diabetes* **48**, 1730-1736 (1999).
20. Hammar,E.B. *et al.* Activation of NF-kappaB by extracellular matrix is involved in spreading and glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 30630-30637 (2005).
21. Juang,J.H., Hsu,B.R., Kuo,C.H. & Uengt,S.W. Beneficial effects of hyperbaric oxygen therapy on islet transplantation. *Cell Transplant.* **11**, 95-101 (2002).
22. Kaneto,H. *et al.* Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem. J.* **320** ( Pt 3), 855-863 (1996).
23. Kawahara,D.J. & Kenney,J.S. Species differences in human and rat islet sensitivity to human cytokines. Monoclonal anti-interleukin-1 (IL-1) influences on direct and indirect IL-1-mediated islet effects. *Cytokine* **3**, 117-124 (1991).
24. Kim,W.H. *et al.* Exposure to chronic high glucose induces beta-cell apoptosis through decreased interaction of glucokinase with mitochondria: downregulation of glucokinase in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **54**, 2602-2611 (2005).

25. Kolb,H. *et al.* Essential contribution of macrophages to islet cell destruction in vivo and in vitro. *J. Autoimmun.* **3 Suppl 1**, 117-120 (1990).
26. Kolb-Bachofen,V., Schraermeyer,U., Hoppe,T., Hanenberg,H. & Kolb,H. Diabetes manifestation in BB rats is preceded by pan-pancreatic presence of activated inflammatory macrophages. *Pancreas* **7**, 578-584 (1992).
27. Leibowitz,G. *et al.* beta-cell glucotoxicity in the Psammomys obesus model of type 2 diabetes. *Diabetes* **50 Suppl 1**, S113-S117 (2001).
28. Liu,K., Paterson,A.J., Chin,E. & Kudlow,J.E. Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic beta cells: linkage of O-linked GlcNAc to beta cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 2820-2825 (2000).
29. Maedler,K. *et al.* FLIP switches Fas-mediated glucose signaling in human pancreatic beta cells from apoptosis to cell replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 8236-8241 (2002).
30. Maedler,K. *et al.* Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J. Clin. Invest* **110**, 851-860 (2002).
31. Maedler,K. *et al.* Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes* **50**, 1683-1690 (2001).
32. Mandrup-Poulsen,T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* **39**, 1005-1029 (1996).
33. Matsuoka,T. *et al.* Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells. *J. Clin. Invest* **99**, 144-150 (1997).
34. Mauricio,D. & Mandrup-Poulsen,T. Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death. *Diabetes* **47**, 1537-1543 (1998).
35. Montanya,E., Nacher,V., Biarnes,M. & Soler,J. Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* **49**, 1341-1346 (2000).
36. Montolio M, Téllez,N., Soler J & Montanya E. Blood glucose modulates cytokine expression in the initial days after syngeneic islet transplantation. *Cell Transplant.* 2007. In Press
37. Montolio,M. *et al.* IL-1beta and iNOS expression in early syngeneic islet transplantation. *Journal of Endocrinology* . 2006. In Press

## Bibliografia discussió

38. Montolio,M., Tellez,N., Biarnes,M., Soler,J. & Montanya,E. Short-term culture with the caspase inhibitor z-VAD.fmk reduces beta cell apoptosis in transplanted islets and improves the metabolic outcome of the graft. *Cell Transplant.* **14**, 59-65 (2005).
39. Murphy,C. & Newsholme,P. The enemy within. The role played by immunostimulated macrophages in the pathogenesis of insulin dependent diabetes mellitus. *Biochem. Soc. Trans.* **25**, 368S (1997).
40. Muruve,D.A., Manfro,R.C., Strom,T.B. & Libermann,T.A. Ex vivo adenovirus-mediated gene delivery leads to long-term expression in pancreatic islet transplants. *Transplantation* **64**, 542-546 (1997).
41. Ogino,T., Zhu,M., Murakami,T., Kuwajima,M. & Shima,K. Effect of partial pancreatectomy on beta-cell mass in the remnant pancreas of Wistar fatty rats. *J. Med Invest* **45**, 103-110 (1998).
42. Ozasa,T. *et al.* Cytokine gene expression in pancreatic islet grafts in the rat. *Transplantation* **64**, 1152-1159 (1997).
43. Pinkse,G.G. *et al.* Integrin signaling via RGD peptides and anti-beta1 antibodies confers resistance to apoptosis in islets of Langerhans. *Diabetes* **55**, 312-317 (2006).
44. Reddy,S., Liu,W. & Elliott,R.B. Distribution of pancreatic macrophages preceding and during early insulinitis in young NOD mice. *Pancreas* **8**, 602-608 (1993).
45. Rhodes,C.J. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* **307**, 380-384 (2005).
46. Schrezenmeir,J. *et al.* The role of oxygen supply in islet transplantation. *Transplant. Proc.* **24**, 2925-2929 (1992).
47. Steil,G.M. *et al.* Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **280**, E788-E796 (2001).
48. Tajiri,Y., Moller,C. & Grill,V. Long-term effects of aminoguanidine on insulin release and biosynthesis: evidence that the formation of advanced glycosylation end products inhibits B cell function. *Endocrinology* **138**, 273-280 (1997).
49. Tanaka,Y., Gleason,C.E., Tran,P.O., Harmon,J.S. & Robertson,R.P. Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 10857-10862 (1999).
50. Tellez,N. *et al.* Adenoviral overexpression of interleukin-1 receptor antagonist protein increases beta-cell replication in rat pancreatic islets. *Gene Ther.* **12**, 120-128 (2005).

51. Thomas,F. *et al.* A tripartite anoikis-like mechanism causes early isolated islet apoptosis. *Surgery* **130**, 333-338 (2001).
52. Topp,B.G., McArthur,M.D. & Finegood,D.T. Metabolic adaptations to chronic glucose infusion in rats. *Diabetologia* **47**, 1602-1610 (2004).
53. Vargas,F. *et al.* Endotoxin contamination may be responsible for the unexplained failure of human pancreatic islet transplantation. *Transplantation* **65**, 722-727 (1998).
54. Welsh,N. *et al.* Is there a role for locally produced interleukin-1 in the deleterious effects of high glucose or the type 2 diabetes milieu to human pancreatic islets? *Diabetes* **54**, 3238-3244 (2005).
55. Zhu,M., Noma,Y., Mizuno,A., Sano,T. & Shima,K. Poor capacity for proliferation of pancreatic beta-cells in Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty rat: a model of spontaneous NIDDM. *Diabetes* **45**, 941-946 (1996).



## **Conclusions**





- 1.- La citocina proinflamatòria IL-1 $\beta$  indueix apoptosi i inhibeix dràsticament la proliferació de les cèl·lules beta dels illots exposats a la citocina. Aquest efecte s'observa quan es combina amb baixes o amb altes concentracions de glucosa.
- 2.- La sobreexpressió d'IL-1Ra en els illots protegeix les cèl·lules beta dels efectes deleteris que té IL-1 $\beta$  sobre la viabilitat i proliferació. A més té un efecte mitogènic sobre les cèl·lules beta.
- 3.- La sobreexpressió d'IL-1Ra en els illots trasplantats millora la supervivència de les cèl·lules beta i n'estimula la proliferació tant a curt com a llarg termini.
- 4.- Els efectes beneficiosos de la sobreexpressió d'IL-1Ra sobre la replicació i viabilitat de les cèl·lules beta es tradueix en una recuperació de la massa beta trasplantada, millorant el pronòstic de l'empelt.
- 5.- Aquest treball suggereix que la citocina proinflamatòria IL-1 deu tenir un paper rellevant en el procés inflamatori que té lloc durant els primers dies després del trasplantament d'illots, perquè només bloquejant el seu efecte ja s'aconsegueix millorar el pronòstic del trasplantament d'illots singènics.



**Producció científica derivada d'aquest treball**



### **Publicacions científiques:**

**Téllez N**, Montolio M, Biarnes M, Castano E, Soler J, Montanya E. Adenoviral overexpression of interleukin-1 receptor antagonist protein increases beta-cell replication in rat pancreatic islets. *Gene Ther.*12:120-128, 2005 (Factor d'impacte 2005: 4.83)

**Téllez N**, Montolio M, Estil·les E, Escoriza J, Soler J, Montanya E. Adenoviral Overexpression of Interleukin-1 Receptor Antagonist Increases Beta cell Replication and Mass in Syngeneically Transplanted Islets, and Improves Metabolic Outcome. *Diabetologia* (Factor d'impacte 2005: 5.33)

### **Comunicacions a congressos:**

Abril 2003: **Téllez Noèlia**, Montanya Eduard. "Replication and apoptosis in rat islets overexpressing Interleukin-1 Receptor Antagonist Protein (IL-1Ra). Satellite Symposium of the Scandinavian Society for the Study of Diabetes (SSSD) "Islet development and Stem cells in diabetes". Helsinki, Finlàndia. Póster.

Maig 2003: **Noèlia Téllez**, Montserrat Biarnés, Marta Montolio, Joan Soler, Eduard Montanya. "Sobreexpressió de l'antagonista del receptor d'interleuquina 1 (IL-1Ra): Efectes sobre la replicació i l'apoptosi de les cèl·lules beta pancreàtiques. Congrés de la Associació Catalana de Diabetis (ACD). Bellaterra, Espanya. Oral.

Juny 2003: **Noèlia Téllez**, Marta Montolio, Montserrat Biarnés, Joan Soler, Eduard Montanya. "Overexpression of Interleukin-1 Receptor Antagonist Protein (IL-1Ra) Restores Beta cell Growth in Interleukin-1 $\beta$  cultured islets". Congrés de la "American Diabetes Association" (ADA). Nova Orleans, EUA. Póster.

Gener 2004: **Noèlia Tellez**, Elisabet Estil·les, Marta Montolio, Joan Soler, Eduard Montanya. "La sobreexpresión del antagonista del receptor de interleuquina 1 (IL-1Ra) incrementa la replicación de las células beta pancreáticas". Primera reunió de la "Red de Centros de Metabolismo y

Nutrición (RCMN) del Instituto de Salud Carlos III de Madrid“. Sitges, Espanya. Oral.

Abril 2004: **Noèlia Tellez**, Elisabet Estil·les, Marta Montolio, Joan Soler, Eduard Montanya. “La sobreexpressió del antagonista del receptor de interleuquina 1 en els illots pancreàtics trasplantats resulta en un augment de la proliferació de les cèl·lules beta i la massa beta trasplantada.” Congrés de la Associació Catalana de Diabetis (ACD). Terrassa, Espanya. Oral.

Maig 2004: **Noèlia Tellez**, Elisabet Estil·les, Marta Montolio, Joan Soler, Eduard Montanya. “Efecto de la sobreexpresión del antagonista del receptor de interleuquina 1 (IL-1Ra) sobre las células beta pancreáticas”. Congrés de la “Sociedad española de Diabetes” (SED). València, Espanya. Oral

Juliol 2004: **Noèlia Téllez**. “Potential dual role of IL-1 $\beta$  in beta cell mass reduction in type 1 diabetes”. Primer Simposium de TONECA. “Coordination action of the aetiology, pathology and prediction of Type 1 Diabetes in Europe”. Hannover, Alemanya. Oral

Setembre 2004: **Noèlia Téllez**, Marta Montolio, Elisabet Estil·les, S. Rodríguez-Mulero, Joan Soler, Eduard Montanya. “Overexpression of IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) increases beta cell replication and mass in transplanted islets”. Congrés de la “European Association for the Study of Diabetes” (EASD). Munic, Alemanya. Oral

Novembre 2004: **Noèlia Tellez**, Marta Montolio, Elisabet Estil·les, S. Rodríguez-Mulero, Joan Soler, Eduard Montanya. “Overexpression of IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) increases beta cell replication and mass in transplanted islets”. 7è congrés internacional de la “Cell Transplant Society”. Boston, EUA. Oral

Juny 2005: **Noèlia Téllez**. “Efectos de IL-1 sobre la replicación beta y antagonismo por IRAP”. Primera reunió del “Grupo de islotes de la Sociedad Española de Diabetes (SED)”. Barcelona, Espanya. Oral