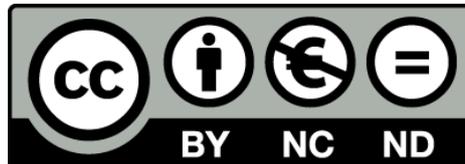


## Efectes de la sobreexpressió d'IGF2 en la protecció i la regeneració de les cèl·lules beta pancreàtiques

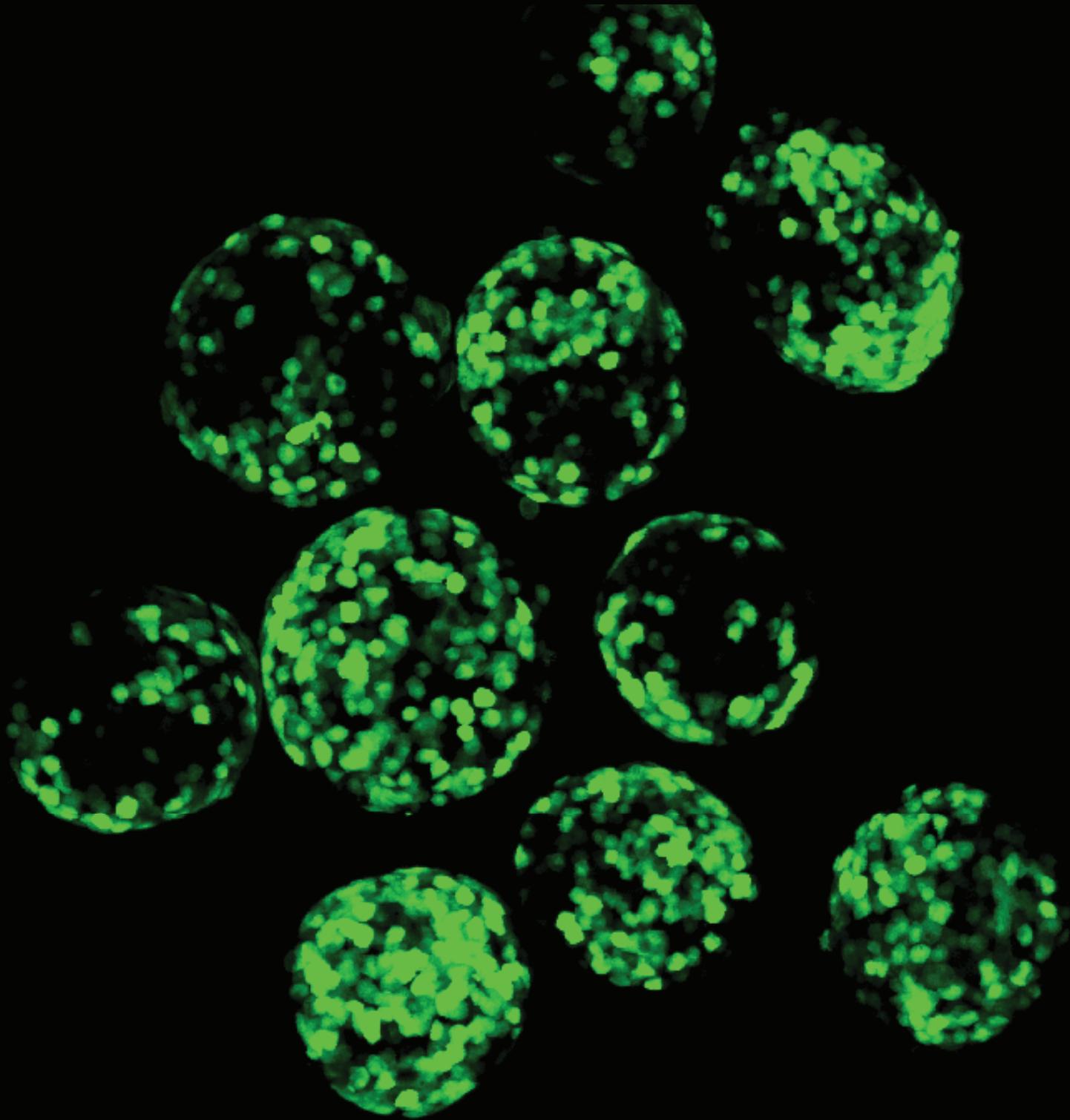
Elisabet Estil·les Altimiras



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**



**EFFECTES DE LA SOBREEXPRESSIÓ D'IGF2  
EN LA PROTECCIÓ I LA REGENERACIÓ  
DE LES CÈL·LULES BETA PANCREÀTIQUES**

Elisabet Estil·les Altimiras  
2014







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

**Efectes de la sobreexpressió d'IGF2 en la protecció i la regeneració de les  
cèl·lules beta pancreàtiques**

**Elisabet Estil·les Altimiras**  
**2014**

**Programa: Medicina**  
**Director: Eduard Montanya Mias**





Memòria presentada per la llicenciada ELISABET ESTIL·LES ALTIMIRAS per optar al grau de doctora.

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

**Elisabet Estil·les Altimiras**

**Dr. Eduard Montanya Mias**





*Sembla que sí, que després de tant de temps, això ja està!*

*I malgrat pugui semblar un tòpic, la veritat és que no ho hauria aconseguit sense tots vosaltres, que m'heu ajudat, ensenyat, recolzat, escoltat, animat a tirar endavant i a no deixar-ho córrer... Gràcies a tots!*

*D'entre totes les persones que heu fet possible que avui la meua tesi sigui, finalment!, una realitat, vull donar les gràcies especialment a l'Eduard, gràcies per oferir-me l'oportunitat de formar part del teu grup de recerca, per confiar en mi per realitzar aquest projecte i per ensenyar-me tant al llarg de tots aquests anys.*

*I també vull agrair a tots als que han passat pel laboratori, als que hi van ser i ja han marxat, als que encara hi són, i als que tot just comencen.*

*Però sobretot vull donar les gràcies a les "nenes del lab" que són amb qui vaig iniciar i amb qui he compartit gran part d'aquesta aventura, amb tots els seus alts i baixos, i que s'han convertit en grans amigues...*

*Noe, que t'he de dir... moltíssimes gràcies per haver-me ajudat sempre, des del primer dia i encara avui! No sé ni per on començar de tantes coses que m'has ensenyat i hem compartit... el meravellós món de les rates, els adenos, el citòmetre, les "presentacions", els bons consells... no acabaria mai! Ja saps que sempre seré el teu "catachumen"! Gràcies per contagiar el teu entusiasme per la ciència i per tantes coses que hem viscut juntes, també fora del lab. Gràcies de tot cor!*

*Marta, tot i que ja fa uns quants anys que no ets al lab, sempre seràs la meua primera companya de poiata, qui ho havia de dir, però la "dark site" ha resultat ser el principi d'una gran amistat! Gràcies per interessar-te, per estar sempre disposada a donar un cop de mà, per tot el que vaig aprendre amb tu, per escoltar-me i per tantes coses que hem compartit, margarites inclosos! Brava Marta! Gràcies!*

*Jessi... cuantas cosas! Inclusiones, islotes, inmunos... sin tu ayuda todo habría sido mucho, muchísimo más largo! Imagina!! Muchas gracias guapa!*

*I no cregueu que m'oblido dels que vau arribar una mica més tard, però que també formeu part important d'aquesta història i amb qui hem compartit un munt de coses...*

*Géraldine, gràcies per tot el teu suport i la teua amistat, i per ensenyar-me l'EndNote! T'asseguro que hagués estat un autèntic viacrucis acabar aquesta tesi sense aquest fantàstic descobriment!*

Mar, per estar sempre disposada a ajudar i a escoltar, molts ànims! Ja saps que et toca...

I també vull agrair als de l'UTIP, que durant la tesi van ser els veïns de l'altre costat de l'autovia i que aquests darrers anys m'han acollit...

Montse, per patir la part final d'aquesta tesi, gràcies per l'ajuda i tots els consells.

I també gràcies als nous fitxatges, que ja no ho són tant, Cris, gràcies pels bons moments i tota la teva ajuda, ja en els nous projectes. Pepelu, gracias por tenderme una mano cuando lo he necesitado, por todas las conversaciones y por animar el lab con tu salero!

I no puc deixar d'agrair a la resta de companys que han passat pel laboratori, Yasmina, la meva "copiloto" preferida, mira que hem rigut! Aleix, Maria de Lluc, Marina, Arturo, Kelly, Adriana, Vero, Rubén, Marc, Gemma, Sílvia... tots vosaltres heu posat el vostre granet de sorra, gràcies per l'ajuda i per ser tant macos!

I també vull agrair a tots els de la quarta planta que m'han donat més d'un cop de mà, en particular a les nefros, als antics infeccioses, a l'Esther i el Benja dels SCT i també el personal de l'estabulari que sempre han tingut cura de les "meves rates", a la Pilar i sobretot al Pedro, Gràcies!

I encara que no sigui gaire ortodoxa, gràcies a tantes rates sense les quals aquest estudi no podria existir...

I com no, agrair a tots els que no formeu part d'aquest petit món que és Bellvitge però que sempre heu estat al meu costat, evitaré fer una llista perquè vosaltres ja ho sabeu, hi sou tots, Gràcies!

I per acabar, vull donar les gràcies a la Gemma, per tot, per suportar-me a casa, principalment aquests dies, i per facilitar-me sempre les coses, Gràcies piper! i... a Tura, per perdre's més d'un passeig, fer-me una mica la punyeta, però sempre fer-me companyia!

I al Pere, per ser-hi sempre que t'he necessitat i per ser el veritable culpable de que avui estigui aquí, per empenyem aquell dia, ja fa uns quants anys, a començar i per donar-me l'empenta per acabar. Gràcies!

En definitiva, gràcies a tots, sense vosaltres no ho hauria aconseguit!

**ÍNDEX**



<b>ABREVIATURES</b> .....	13
<b>RESUM</b> .....	23
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	29
<b>1. El pàncrees, l'illot pancreàtic i la cèl·lula beta</b> .....	31
1.1. Control de la homeòstasi de la glucosa.....	34
1.2. La insulina.....	34
1.3. La secreció d'insulina.....	36
1.3.1. Secreció d'insulina estimulada per glucosa.....	36
<b>2. Regulació de la massa cel·lular beta</b> .....	39
2.1. Canvis en el nombre de les cèl·lules beta.....	39
2.1.1. Neogènesi.....	40
2.1.2. Replicació.....	43
2.1.2.1 Cicle cel·lular de les cèl·lules beta.....	43
2.1.3. Mort cel·lular.....	45
2.1.3.1. Apoptosi.....	45
2.1.3.2 Necrosi.....	47
2.2. Canvis en la mida de les cèl·lules beta.....	48
<b>3. Diabetis Mellitus</b> .....	50
3.1. Classificació de la diabetis mellitus.....	51
3.2. Diabetis Mellitus tipus 1.....	53
3.2.1. Factors implicats en l'atac autoimmune en la diabetis tipus 1.....	53
3.2.1.1. Factors ambientals.....	54
3.2.1.2. Factors genètics.....	56
3.2.2. Mecanisme de l'atac autoimmune contra les cèl·lules beta.....	56
3.3. Diabetis Mellitus tipus 2.....	61
3.3.1. Patogènesi de la diabetis mellitus tipus 2.....	62
<b>4. Citocines proinflamatores</b> .....	65
4.1. Família de la interleucina 1 (IL-1).....	65
4.1.1. La interleucina 1 (IL-1).....	66
4.2. Senyalització intracel·lular de la interleucina 1 (IL-1).....	66
4.3. IL-1 $\beta$ i la cèl·lula beta.....	69
4.3.1. IL-1 $\beta$ i funció de la cèl·lula beta.....	69

4.3.2. IL-1 $\beta$ i viabilitat de la cèl·lula beta.....	70
4.3.3. IL-1 $\beta$ i proliferació de la cèl·lula beta.....	71
4.4. IL-1 $\beta$ i la diabetis mellitus.....	72
4.4.1. IL-1 $\beta$ i la diabetis mellitus tipus1.....	72
4.4.2. IL-1 $\beta$ i la diabetis mellitus tipus 2.....	73
4.5. IL-1 $\beta$ i la destrucció dels illots pancreàtics trasplantats.....	74
<b>5. Teràpies per la diabetis.....</b>	<b>75</b>
5.1. Teràpia regenerativa.....	75
5.2. Teràpia substitutiva.....	77
5.2.1. Transplantament de pàncrees.....	78
5.2.2. Trasplantament cel·lular.....	78
5.2.2.1. Transplantament d'illots pancreàtics.....	79
5.2.2.1.1. Antecedents històrics.....	80
5.2.2.1.2. Limitacions del trasplantament d'illots pancreàtics.....	81
5.2.2.1.3. Perspectives i trasplantament experimental d'illots.....	84
5.2.2.2. Fonts alternatives de cèl·lules productores d'insulina.....	85
5.2.2.2.1. Expansió <i>in vitro</i> de cèl·lules beta.....	85
5.2.2.2.2. Obtenció de cèl·lules productores d'insulina a partir de cèl·lules mare embrionàries.....	87
5.2.2.2.3. Obtenció de cèl·lules productores d'insulina a partir de cèl·lules pluripotencials induïdes (iPS).....	88
5.2.2.2.4. Transdiferenciació de cèl·lules no beta a cèl·lules productores d'insulina.....	89
5.3. Teràpia gènica.....	92
5.3.1. Vectors per teràpia gènica .....	93
5.3.1.1. Vectors no virals.....	94
5.3.1.2. Vectors virals.....	94
5.3.2. Adenovirus.....	97
5.3.2.1. Estructura dels adenovirus.....	97
5.3.2.2. Infecció amb adenovirus.....	99
5.3.2.3. Adenovirus com a vectors d'expressió.....	102
5.3.2.4. Adenovirus i l'illot pancreàtic.....	105

5.3.3. Teràpia gènica en diabetis.....	106
<b>6. Factors de creixement similars a la insulina.....</b>	<b>109</b>
6.1. Antecedents històrics.....	109
6.2. Elements del sistema IGF/Insulina.....	110
6.2.1. Els factors de creixement similars a la insulina: IGF1 i IGF2.....	112
6.2.1.1. Factor de creixement similar a la insulina 1 (IGF1).....	113
6.2.1.2. Factor de creixement similar a la insulina 2 (IGF2).....	113
6.2.1.2.1. Precursors de l'IGF2.....	115
6.2.3. Receptors.....	116
6.2.3.1. El receptor d'IGF1 (IGF1R).....	116
6.2.3.2. El receptor d'IGF2 (IGF2R).....	118
6.2.3.3. El receptor de la insulina (IR).....	118
6.2.3.4. Els receptors híbrids.....	120
6.2.3.5. Afinitat dels lligands pels diferents receptors.....	120
6.2.4. Les proteïnes d'unió als IGFs (IGFBP).....	121
6.2.5. Transducció del senyal de la insulina i els IGFs.....	122
6.2.5.1. Conseqüències biològiques de la senyalització dels IGFs.....	123
6.2.6. Vies de senyalització.....	125
6.3. IGF2 i la cèl·lula beta.....	127
<b>HPÒTESI I OBJECTIUS.....</b>	<b>131</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>135</b>
<b>Estudi 1</b>	
<i>High sensitivity of beta-cell replication to the inhibitory effects of interleukin-1beta: modulation by adenoviral overexpression of IGF2 in rat islets.....</i>	<i>137</i>
<b>Estudi 2</b>	
<i>Increased beta cell replication, and beta cell mass regeneration in syngeneically transplanted rat islets overexpressing insulin-like growth factor-II.....</i>	<i>157</i>
<b>DISCUSSIÓ.....</b>	<b>179</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>199</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>203</b>
<b>PRODUCCIÓ CIENTÍFICA DERIVADA D'AQUEST TREBALL.....</b>	<b>243</b>



## **ABREVIATURES**



## A

AAV: Vectors virals adenoassociats

AC: Adenilat ciclase

Acetil CoA: Acetilcoenzim A

Ad-GFP: Adenovirus codificant per la proteïna verda fluorescent

Ad-IGF2: Adenovirus codificant pel factor de creixement similar a la insulina 2

Ad-Luc: Adenovirus codificant per la luciferasa

ADA: Associació americana de diabetis (*American Diabetes Association*)

ADP: Adenosina difosfat

AKT: Proteïna quinasa B

AMPC: Monofosfat d'adenosina cíclic

APC: Cèl·lula presentadora d'antigen

ATP: Adenosina trifosfat

ATPasa: Proteïna que catalitza la degradació d'ATP a ADP

AUC: Àrea sota la corba

## B

BafA1: Bafilomicina A1.

BrdU: Bromo-deoxi-uridina

BSA: Albúmina sèrica bovina

BTC: Betacel·lulina.

## C

c-myc: Homòleg cel·lular de l'oncogen víric de la mielocitomatosis

CAR: Receptor coxsackie adenovirus

Abreviatures

CASP: Caspasa

COX: Ciclooxygenasa

CPA: Carboxipeptidasa A

CTLA-4: Proteïna 4 associada a limfòcits T citotòxics

## **D**

DAB: 3,3- diaminobenzidina tetrahydroclorur

DM: Diabetis mellitus

DNA: Àcid desoxiribonucleic

## **E**

ECM: Matriu extracel·lular

EGF: Factor de creixement epidèrmic

EI: Eficiència d'infecció

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

EMT: Transició epiteli mesènquima

ERBB3: Receptor tirosina quinasa ErbB3

ERK: Quinasa relacionada amb senyals extracel·lulars

ES: Cèl·lules mare

Ex-4: Exendina 4

## **F**

FAD: Dinucleòtid de flavina i adenina (forma oxidada)

FADH<sub>2</sub>: Dinucleòtid de flavina i adenina (forma reduïda)

FasL: Lligand de Fas

FDA: Diacetat de fluoresceïna

FLIP: FLICE-inhibitory protein

## **G**

G6P: Glucosa 6 fosfat

GAD: Àcid glutàmic descarboxilasa

GADA: Anticòs anti-àcid glutàmic descarboxilasa

GH: Hormona del creixement

GLP-1: Pèptid similar al glucagó 1

GLUT2: Transportador de glucosa 2

Grb2 : Proteïna d'unió 2 al receptor del factor de creixement

GSK-3: Glucogen sintasa quinasa-3

GTP: Guanidinatrifosfat

GWAS: Estudis d'associació de genoma complet

## **H**

HDAC: Deacetilasa d'histones

HGF: Factor de creixement d'hepatòcits

HLA: Antigen leucocitari humà

HNF-1 $\beta$ : Factor nuclear hepàtic 1 $\beta$

## **I**

IA-2A: Anticòs anti-tirosinafosfatasa

IAA: Anticòs anti-insulina

ICA: Anticòs anti-illot

ICAM: Molècula d'adhesió intercel·lular

ICE: Enzim convertidor d'IL-1

## Abreviatures

IDF: Federació Internacional de la Diabetis

IEQ: Illot equivalent

IFN- $\gamma$ : Interferó  $\gamma$

IGF1: Factor de creixement similar a la insulina 1

IGF2: Factor de creixement similar a la insulina 2

IGF1R: Receptor d'IGF1

IGF2R: Receptor d'IGF2

IGFBP: Proteïnes d'unió als IGFs

IL: Interleucina

IL-1R: Receptor d'IL-1

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

IL-1RacP: Proteïna accessòria acoblada al receptor d'IL-1

ILA: Activitat tipus insulina

iNOS: Sintasa de l'òxid nítric induïble

INS-1: Cèl·lules d'insulinoma de rata

IP: Iodur de propidi

IP3: Inositol trifosfat

IR: Receptor de la insulina

IRAK: Proteïna quinasa associada al receptor d'IL-1

IRS: Substrat del receptor d'insulina

ITR: Repetició terminal invertida

## **J**

JAK: Quinasa Janus

JUNK: Quinasa c-jun aminoterminal

## K

$K_{ATP}$ : Canal de  $K^+$  dependent d'ATP

Kd: Constant de dissociació

Kir6.2: Canal de potassi que rectifica cap a l'interior

Km: Constant de Michaelis Menten

KRBH: Krebbs ringer

## L

LDH: Lactat deshidrogenasa

LIF: Factor inhibidor de leucèmia

LPLD: Deficiència de la lipoproteïna lipasa

## M

MafA: *Musculo Aponeurotic Fibrosarcoma homolog A*

MAPK: Proteïna quinasa activada per mitògens

MEK: Proteïna fosforiladora de MAPK

MHC: Complex major d'histocompatibilitat

MODY: *Maturity Onset Diabetes of the Young*

MOI: Multiplicitat d'infecció

mTOR: Proteïna diana de la rapamicina en mamífers

## N

$NAD^+$ : Nicotinamida adenina dinucleòtid (forma oxidada)

NADH: Nicotinamida adenina dinucleòtid (forma reduïda)

NFκB: Factor nuclear κB

Ngn: Neurogenina

Abreviatures

NIK: Quinasa inductora de NFκB

NO: Òxid nítric.

NOD: Diabètic no obès

NSILA: Activitat tipus insulina no suprimible

## O

OMS: Organització Mundial de la Salut

## P

PBS: Tampó fosfat salí

PDX-1: *Pancreatic Duodenal Homeobox-1*

PFA: Paraformaldehid

Pfu: Unitats formadores de calves

PI3K: Fosfatidil inositol 3 quinasa

PIP2: Fosfatidilinositol difosfat

PIP3: Fosfatidilinositol trifosfat

PKA: Proteïna quinasa A

PKB: Proteïna quinasa B, també denominada Akt

PKC: Proteïna quinasa C

PL: Lactogen placentari

PLN: Nòdul limfàtic pancreàtic

PNF: Pèrdua de funció primària

Pol: Polimerasa

PP: Polipèptid pancreàtic

PRL: Prolactina

Proteïna G: Proteïna de unió a nucleòtids de guanina

PTB: Domini d'unió a fosfotirosines

Ptf1a: Factor de transcripció 1a específic de pàncrees

PTPN: Proteïna tirosina fosfatasa no receptora

Px: Pancreatectòmia

## R

RCA: Adenovirus replicatius competents

RNA(m): Àcid ribonucleic (missatger)

ROI: Espècies reactives d'oxigen

## S

S6K1: Proteïna ribosomal S6 quinasa 1

SCNT: Transferència nuclear de cèl·lules somàtiques

Ser: Serina

SILA: Activitat tipus insulina suprimible

SH2: *Src homology 2*

SNAP: Proteïna soluble d'adhesió a NSF (factor sensible a la N-etilmaleimida)

SNARE: Receptor SNAP

Src: Família de proteïnes tirosina quinases proto-oncogèniques relacionades amb fibrosarcoma

STAT: Transductor de senyal i activador de la transcripció

STZ: Estreptozotocina

SUR: Receptor de sulfonilureas

## T

TGF: Factor de creixement transformant

TNF: Factor de necrosi tumoral

## Abreviatures

TRAF: Factor associat al receptor de TNF

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*

Tx: Trasplantament

Tyr: Tirosina

## V

VCAM: Molècula d'adhesió cel·lular vascular

VEGF: Factor de creixement de l'endoleli vascular

VIH: Virus de la immunodeficiència humana

## Z

ZnT8: Transportador de Zn 8

**RESUM**



L'últim informe de l'organització mundial de la salut (OMS) ha inclòs a la diabetis mellitus en el seu llistat de les 10 principals causes de mort a nivell mundial. Segons dades de la Federació Internacional de la Diabetis (IDF) del 2013, la diabetis afecta un total de 382 milions de persones en tot el món i es calcula que aquest nombre arribarà fins a 592 milions en menys de 25 anys. Del total de persones afectades entre el 85-95% són diabètics tipus 2 i al voltant d'un 10% són diabètics tipus 1, però s'estima que la diabetis tipus 1 en els joves també presentarà un inexplicable i ràpid increment en diverses regions del món juntament amb l'augment de la incidència de diabetis tipus 2 en les poblacions més joves. Un aspecte central, tant en el desenvolupament de la diabetis tipus 1 com en el de la tipus 2, és la reducció del nombre de cèl·lules beta productores d'insulina. En la diabetis tipus 1 la pèrdua de massa beta es dona per una destrucció autoimmunitària selectiva de les cèl·lules beta, mentre que en la diabetis tipus 2 existeix una alteració de la funció beta que, conjuntament amb la reducció parcial de la massa beta, desemboca en la incapacitat de fer front a la demanda metabòlica generada per la resistència a la insulina.

El trasplantament d'illots és una teràpia prometedora per la curació de la diabetis mellitus. Amb aquest tractament s'ha aconseguit un control acurat de la glucèmia de l'individu. Ara bé, una de les limitacions del trasplantament d'illots radica en la baixa disponibilitat d'òrgans i la seva elevada demanda, agreujada per l'alt nombre d'illots requerits per restablir la normoglicèmia del pacient diabètic. Un dels motius pel qual és necessari trasplantar un elevat nombre d'illots als receptors diabètics és la important pèrdua de massa beta que té lloc els primers dies post-trasplantament. Aquesta pèrdua es deu als alts nivells d'apoptosi i de necrosi de les cèl·lules beta i a la seva limitada proliferació incapaç de compensar la mort.

S'hipotetitza que la interleucina 1 (IL-1) té un paper clau en la destrucció de les cèl·lules beta pancreàtiques que es dona en la diabetis mellitus tipus 1 i tipus 2. A més, la citocina juga un paper important en l'increment de la mort beta que té lloc durant els primers dies després del trasplantament d'illots pancreàtics. En aquest sentit, en el nostre grup hem detectat l'expressió d'IL-1 $\beta$  en els empelts els primers dies post-trasplantament. També hem demostrat que la IL-1 juga un paper important en la pèrdua de la massa beta trasplantada, ja que amb la inhibició del seu efecte s'aconsegueix augmentar la replicació i la massa de les cèl·lules beta i millorar el pronòstic del trasplantament d'illots.

Per tant, les estratègies orientades a reduir l'expressió de la IL-1 a l'empelt o a contrarestar les seves accions deletèries sobre els illots trasplantats, així com aquelles dirigides a restablir o regenerar la massa beta podrien ser útils en el desenvolupament de teràpies contra la diabetis i en la millora del pronòstic del trasplantament d'illots.

El factor de creixement similar a la insulina 2 (IGF2) és un potent factor de creixement que té un rol important promovent la diferenciació i la proliferació cel·lular i actuant com a factor de supervivència en limitar l'apoptosi en diferents tipus cel·lulars. Els efectes d'IGF2 en els illots pancreàtics han estat demostrats tant *in vitro* com *in vivo*. *In vitro* s'ha descrit que IGF2 promou la síntesi de DNA en línees cel·lulars beta, en illots de rata i illots fetals humans. *In vivo* els efectes mitogènics d'IGF2 s'han posat de manifest en ratolins transgènics que sobreexpressen el factor de creixement. En illots adults, les accions d'IGF2 com a factor de supervivència s'han determinat en rates alimentades amb una dieta baixa en proteïnes i en un model de trasplantament d'illots encapsulats, en que s'ha mostrat que la incubació dels illots amb IGF2, prèviament al trasplantament, redueix la seva mort. També s'ha descrit que l'IGF2 protegeix els illots enfront dels efectes deleteris de les citocines. Per tant, IGF2 podria tenir un doble rol beneficiós en la massa beta, actuant sobre les cèl·lules beta pancreàtiques com a factor mitogènic i com a factor de supervivència.

La hipòtesis general del projecte és que el pronòstic del trasplantament d'illots pot millorar amb la utilització d'estratègies orientades a incrementar la supervivència i la replicació de les cèl·lules beta. Hipotetitzem que la sobreexpressió d'IGF2 pot millorar el pronòstic del trasplantament d'illots pancreàtics en augmentar la massa beta mitjançant la reducció de l'apoptosi i l'augment de la proliferació de les cèl·lules beta. L'objectiu del projecte és determinar si la sobreexpressió d'IGF2 en els illots pancreàtics millora la supervivència i la replicació de les cèl·lules beta pancreàtiques, limitant els efectes deleteris d'IL-1 $\beta$  sobre els illots en cultiu i millorant el pronòstic del trasplantament.

L'estudi dels efectes de la IL-1 $\beta$  i de la sobreexpressió d'IGF2 *in vitro* es va realitzar amb un cultiu primari d'illots de rata que van ser exposats durant 48 h a 5.5 o 22.2 mM de glucosa en presència o absència de 1, 10, 30 i 50 U/ml d'IL-1 $\beta$ . IGF2 es va sobreexpressar mitjançant un vector adenoviral. Després de 48h de la infecció el 100% dels illots i el 29% de les cèl·lules de l'illot expressaven el transgen. Aquesta eficiència de la infecció ens va permetre assolir uns

nivells d'expressió d'IGF2 en els illots infectats suficients per poder demostrar els efectes beneficiosos sense alterar la viabilitat, la funció ni la replicació de les cèl·lules beta dels illots.

La proliferació de les cèl·lules beta (determinada per incorporació de BrdU) es va veure dràsticament reduïda quan els illots es van exposar a 10, 30 i 50 U/ml d'IL-1 $\beta$ , tant a baixa com a alta glucosa. En els illots exposats a 10 U/ml d'IL-1 $\beta$  la replicació de les cèl·lules beta va disminuir substancialment, i es va suprimir gairebé completament en els illots exposats a 30 i 50 U/ml d'IL-1 $\beta$ . En absència d'IL-1 $\beta$ , la sobreexpressió d'IGF2 va doblar la replicació de les cèl·lules beta tant en els illots cultivats a baixes com a altes concentracions de glucosa i va exercir un efecte protector sobre la replicació en els illots exposats a 10 U/ml d'IL-1 $\beta$ , que van mantenir uns nivells de proliferació beta similars als dels illots control no exposats a la citocina. No obstant això, la IL-1 $\beta$  també va suprimir la replicació de les cèl·lules beta en els illots que sobreexpressaven IGF2 exposats a altes concentracions de la citocina (30 i 50 U/ml), cultivats en ambdues concentracions de glucosa. La glucosa no va modular l'efecte inhibitori de la IL-1 $\beta$  sobre la replicació de les cèl·lules beta.

L'apoptosi de les cèl·lules beta dels illots exposats a la citocina (determinada per la tècnica del TUNEL) va augmentar de forma dosi dependent, tant en els illots cultivats a altes com a baixes concentracions de glucosa, però va ser superior en les cèl·lules beta dels illots cultivats a baixa glucosa, que presentaven un augment significatiu de l'apoptosi quan es van exposar a 10U/ml d'IL-1 $\beta$ , en els illots cultivats a alta glucosa van ser necessàries 30 i 50 U/ml d'IL-1 $\beta$  per augmentar-ne l'apoptosi de manera consistent. La sobreexpressió d'IGF2 en els illots va presentar una clara acció antiapoptòtica. En tots els grups que van presentar un augment de l'apoptosi induïda per IL-1 $\beta$  la sobreexpressió d'IGF2 va reduir l'apoptosi de les cèl·lules beta, pel que van ser necessàries concentracions superiors de la citocina per induir un augment significatiu de l'apoptosi respecte els illots control. L'efecte protector de la glucosa es va confirmar en els illots que sobreexpressaven IGF2 exposats a 30 U/ml d'IL-1 $\beta$  que van mostrar un increment de l'apoptosi de les cèl·lules beta només quan es van cultivar a baixa glucosa.

L'estudi dels efectes de la sobreexpressió d'IGF2 en els illots trasplantats es va portar a terme utilitzant un model de trasplantament singènic. Grups de 500 illots control (no infectats) o 500 illots que sobreexpressaven IGF2 es van trasplantar sota la càpsula renal de rates Lewis diabètiques. 500 illots és una massa beta clarament insuficient per restablir la normoglicèmia, per tant els animals d'ambdós grups es van mantenir hiperglicèmics al llarg de l'estudi. Els

empelts es van recuperar els dies 3, 10 i 28 després del trasplantament i es van processar per realitzar els estudis histològics.

La sobreexpressió d'IGF2 en els illots trasplantats va provocar un augment de la proliferació de les cèl·lules beta dels empelts a dia 3, 10 i 28. L'apoptosi de les cèl·lules beta no es va modificar per la sobreexpressió d'IGF2. L'àrea individual de les cèl·lules beta va augmentar de manera similar tant en els empelts d'illots control com en els illots que sobreexpressaven IGF2 als 10 i 28 dies post- trasplantament. Per últim, la sobreexpressió d'IGF2 va resultar en un increment de la massa beta.

Per determinar si els efectes beneficiosos de la sobreexpressió d'IGF2 permetien la reducció del nombre d'illots necessaris per restablir la normoglicèmia, es van trasplantar 800 illots, que es una massa beta subcrítica, d'illots control no infectats, illots infectats amb un adenovirus control (Ad-Luc) i illots que sobreexpressaven IGF2. El 100% dels animals trasplantats amb illots que sobreexpressaven IGF2 van assolir la normoglicèmia 10 dies després del trasplantament i la varen mantenir fins a l'extracció de l'empelt, a dia 60. En canvi, només el 14% dels animals trasplantats amb illots control (illots no transfectats i illots Ad-Luc) van assolir la normoglicèmia a dia 10 post-trasplantament, i tan sols el 71% dels animals van aconseguir la normoglicèmia al llarg del temps de seguiment (entre els dies 21 i 28 després del trasplantament).

En conclusió, l'estudi dels efectes de la sobreexpressió d'IGF2 i la IL-1 $\beta$  *in vitro* ens ha permès analitzar el doble efecte que exerceix la citocina proinflamatòria IL-1 $\beta$  sobre les cèl·lules beta pancreàtiques dels illots; d'una banda inhibint dràsticament la seva proliferació i de l'altra induint-ne l'apoptosi. També hem mostrat l'alta sensibilitat de la replicació de les cèl·lules beta als efectes deleteris de la IL-1 $\beta$ . A més, hem pogut determinar que la sobreexpressió d'IGF2 estimula la proliferació de les cèl·lules beta, protegeix dels efectes deleteris de la IL-1 $\beta$  sobre la viabilitat i protegeix, en part, del profund efecte inhibitori de la citocina sobre la replicació de les cèl·lules beta. *In vivo* hem demostrat que la sobreexpressió d'IGF2 en els illots trasplantats estimula la proliferació de les cèl·lules beta de manera sostinguda després del trasplantament, però no en redueix l'apoptosi. Aquest increment de la replicació en els empelts d'illots que sobreexpressen IGF2 es tradueix en la regeneració de la massa beta trasplantada, fet que es reflexa en la millora del pronòstic del trasplantament. En conjunt, aquests resultats suggereixen que estratègies dirigides a augmentar la proliferació beta poden ser útils per induir la regeneració de la massa beta pel tractament de la diabetis i en el trasplantament d'illots.

# **INTRODUCCIÓ**



## 1. EL PÀNCREES, L'ILLOT PANCREÀTIC I LA CÈL·LULA BETA

El pàncrees és un òrgan d'origen endodèrmic que té un paper clau en la regulació de la digestió de proteïnes i glúcids i en la homeòstasi de la glucosa. Generalment el pàncrees es subdivideix en 3 regions: el cap (porció interior a la corba del duodè), el cos (corresponent a la regió central) i la cua (part extrema, propera a l'íli) (Fig. 1).

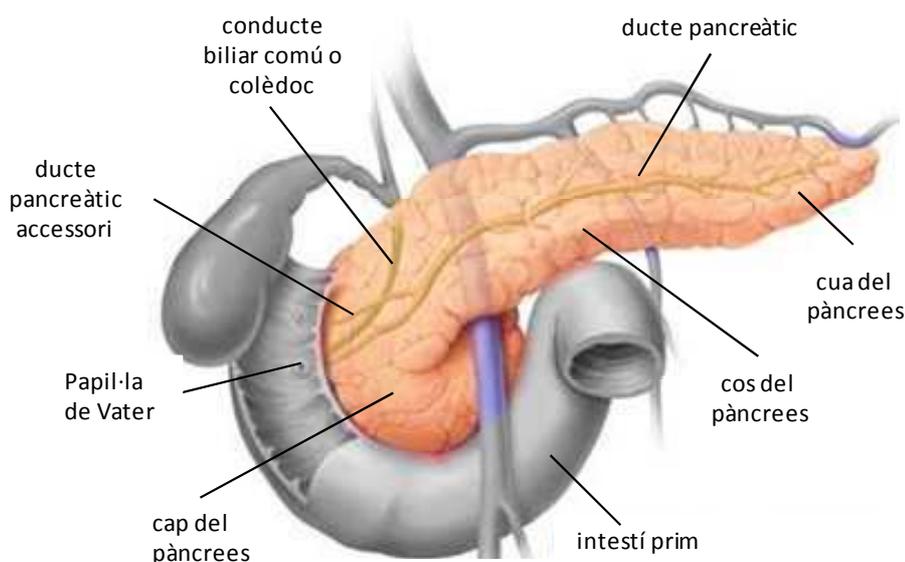


Figura 1. Representació esquemàtica del pàncrees humà. Modificat de [medicinayprevencion.com](http://medicinayprevencion.com).

La formació del pàncrees s'inicia de manera primerenca durant el desenvolupament embrionari. La morfogènesi pancreàtica es fa evident quan dos primordis, un dorsal i un ventral, es fan visibles en la zona de l'endoderm de l'intestí primitiu que donarà lloc al duodè. Durant el desenvolupament es dona el creixement i la ramificació de l'epiteli dels dos primordis pancreàtics els quals pateixen una reorientació i es fusionen formant un únic òrgan bipolar. El primordi pancreàtic ventral, amb intima relació amb el colèdoc, formarà la part posterior del cap del pàncrees i el primordi dorsal donarà lloc a la cua i el cos del pàncrees. La diferenciació endocrina és aparent des de les etapes més inicials del desenvolupament embrionari, en un primer moment la majoria de cèl·lules formades són positives per glucagó, posteriorment es produeix la diferenciació exponencial de cèl·lules endocrines, majoritàriament beta, a partir de

precursors, és el que es coneix com a transició secundària, i finalment les cèl·lules comencen a agrupar-se, però no és fins les primeres setmanes després del naixement que els illots seran plenament madurs.

El pàncrees exerceix una doble funció, és simultàniament una glàndula exocrina i endocrina. Aquesta divisió funcional és clarament diferenciable a nivell histològic, de manera que dins el teixit pancreàtic podem distingir el pàncrees exocrí i el pàncrees endocrí. El pàncrees exocrí representa el 80% de la massa tissular de l'òrgan i és l'encarregat de la producció del suc pancreàtic, ric en enzims digestius. El pàncrees exocrí està format per cèl·lules acinars, centreacinars i ductals. Les cèl·lules exocrines envolten el pàncrees endocrí que és el responsable de la síntesi d'hormones relacionades amb el control de la glucèmia i està constituït per agrupacions de cèl·lules endocrines, que reben el nom d'illots pancreàtics o illots de Langerhans, en reconeixement a Paul Langerhans que els va descriure l'any 1869.

Els illots pancreàtics es distribueixen per tota la porció exocrina del pàncrees, tot i ser més abundants en la cua del pàncrees (Reers et al., 2009), i representen entre l'1 i el 2% de la massa total del pàncrees adult. Els illots pancreàtics estan envoltats per una càpsula de teixit connectiu característica que els ajuda a mantenir la seva integritat estructural. En un pàncrees humà hi ha aproximadament 1 milió d'illots, entre 1000 i 2000 en el pàncrees de rata i uns 500 en el de ratolí. Cada illot conté aproximadament unes 2000 cèl·lules que constitueixen un mosaic de diversos tipus cel·lulars que secreten diferents hormones.

Es coneixen quatre tipus cel·lulars ben caracteritzats que constitueixen els illots pancreàtics: les cèl·lules beta ( $\beta$ ), alfa ( $\alpha$ ), delta ( $\delta$ ) i PP encarregades de sintetitzar i secretar insulina, glucagó, somatostatina i polipèptid pancreàtic respectivament. Més recentment han estat descrites les cèl·lules  $\epsilon$  que secreten ghrelina. Cada un dels tipus cel·lulars presenta una distribució característica i es troba formant part dels illots en diferents proporcions.

Les cèl·lules beta són les més abundants, són cèl·lules altament diferenciades i especialitzades i són l'únic tipus cel·lular de l'organisme adult capaç de sintetitzar i secretar insulina, característica que les fa indispensables pel correcte manteniment dels nivells de glucosa en sang de l'individu; representen, en el cas dels rosegadors, entre un 70 i un 80% de les cèl·lules insulars i es situen majoritàriament al centre de l'illot envoltades per les cèl·lules alfa que es troben en una proporció d'entre el 8 i el 12%, les cèl·lules delta que corresponen a un 4-8%, les

cèl·lules PP que representen un 3-4% de les cèl·lules endocrines i, finalment les cèl·lules  $\epsilon$  que són les més escasses, suposen menys d'un 1% de les cèl·lules de l'illot i presenten una distribució aleatòria (Fig. 2). A més de les cèl·lules secretores endocrines, els illots estan ben innervats i contenen abundants capil·lars que permeten que les hormones produïdes siguin alliberades directament a la sang i, a través de la vena porta, siguin transportades cap al fetge i a la resta de l'organisme.

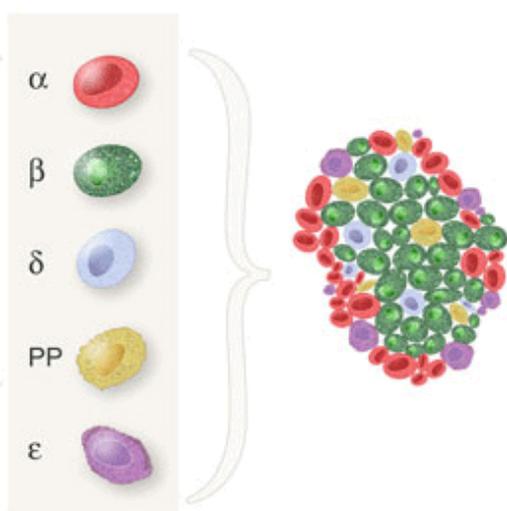


Figura 2. Il·lustració esquemàtica d'un illot de Langerhans. Obtinguda de Beta Cell Consortium de JP Cartellier.

Els illots pancreàtics són els responsables del control glucèmic de l'individu, el qual porten a terme mitjançant la participació de les tres hormones principals secretades per les cèl·lules de l'illot: la insulina, el glucagó i la somatostatina. La insulina redueix els nivells de glucosa, ja que n'estimula la captació per part dels teixits perifèrics i la conversió a glicogen. El glucagó, contràriament a l'acció de la insulina, fa augmentar la glucèmia, incrementant l'activitat fosforilasa, la qual cosa provoca que es mobilitzi la reserva de glicogen a glucosa. I per últim la somatostatina que actua inhibint tant la secreció de la insulina com la del glucagó.

### **1.1. Control de la homeòstasi de la glucosa**

La glucosa és la principal font d'energia per les cèl·lules, fet que determina que la regulació dels seus nivells en sang dins d'un estret marge sigui essencial per l'organisme, ja que la desregulació de la seva concentració pot esdevenir crítica per a la supervivència.

La regulació dels nivells de glucosa en sang i, en últim terme de l'equilibri energètic, es realitza mitjançant la secreció coordinada d'insulina i glucagó pel pàncrees. Ambdues hormones són claus en el control de la producció i la utilització de la glucosa per part de l'organisme.

Durant el període postprandial es donen tres processos que de forma sinèrgica garanteixen el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa. En primer lloc, es dona l'estimulació de la producció i la secreció d'insulina per les cèl·lules beta del pàncrees. En segon lloc, en els teixits perifèrics (fetge, múscul i teixit adipós) es dona la captació de la glucosa, promoguda per l'increment de la insulina en sang. I per últim, es redueix la producció hepàtica de glucosa com a resultat de la inhibició de la secreció de glucagó.

En dejú, l'augment del glucagó i altres factors hormonals i nerviosos mantenen els nivells de glucosa a través d'un increment de la producció hepàtica de glucosa per estimulació de la gluconeogènesi i de la glicogenòlisi.

Tota alteració de la funcionalitat de les cèl·lules beta, del fetge, del múscul o del teixit adipós pot desencadenar trastorns en l'homeòstasi de la glucosa i portar a estats patològics.

### **1.2. La insulina**

El gen de la insulina humana es troba situat en la regió p15.5 del cromosoma 11 (Orci, 1982) i està constituït per 3 exons i 2 introns (Steiner et al., 1985). Els rosegadors tenen 2 gens que codifiquen per a les insulines 1 i 2. En el cas de les rates, els dos gens que codifiquen per les insulines 1 i 2 es troben en el cromosoma 1, en canvi, en els ratolins els dos gens es troben situats en dos cromosomes diferents, el cromosoma 7 i el cromosoma 9.

El promotor del gen de la insulina presenta llocs d'unió per diversos factors de transcripció (Melloul et al., 2002), com el PDX-1 (de l'anglès, Pancreatic Duodenal Homeobox 1), que són

imprescindibles per l'expressió del gen i que condicionen el grau de diferenciació de la cèl·lula beta.

El transcrit de RNA (àcid ribonucleic) té uns 1500 nucleòtids, i els seus nivells estan modulats per glucosa, AMPc (fosfat d'adenosina cíclic) i dexametasona, a més d'altres substrats com diversos sucres, nutrients, aminoàcids, citocines i ions que també tenen la capacitat de regular l'expressió del gen.

En situació fisiològica, la regulació de la síntesi de la insulina per glucosa es produeix principalment per control post-transcripcional del RNA i la traducció a preproinsulina (Giddings et al., 1982; Nielsen et al., 1985; Weber et al., 1998).

La insulina es sintetitza en les cèl·lules beta com a precursor: la preproinsulina. La preproinsulina es forma en el reticle endoplasmàtic rugós i conté un pèptid senyal que es escindit en el pol cis de l'aparell de Golgi formant la proinsulina. La proinsulina és una molècula més estable que passa al pol trans de l'aparell de Golgi, on es formaran els grànuls de secreció (Rhodes, 2000). És en els grànuls de secreció on es dona la maduració final de la proinsulina a insulina.

En el grànul la proinsulina és tallada per dues convertases (Endopeptidasa 1 i 2)(Rhodes and Alarcón, 1994) donant lloc a la insulina de 6 kDa i al pèptid C de 3 kDa. La insulina que es va produint precipita i forma cristalls amb àtoms de zinc presents en el grànul. La insulina precipitada quedarà situada en el centre del grànul, el pèptid C, més soluble, restarà a la perifèria d'aquest.

El grànul de secreció madur migrarà cap a la membrana plasmàtica guiat pels microtúbuls de la cèl·lula, un cop a la membrana plasmàtica es fusionarà amb aquesta en un procés en el qual participen les proteïnes SNARE de la maquinaria de fusió (Jahn and Südhof, 1999; Weber et al., 1998). Finalment els productes de la secreció seran alliberats a l'espai extracel·lular en resposta a estímuls altament regulats per dur a terme la seva acció biològica.

### 1.3. La secreció d'insulina

El citoplasma de les cèl·lules beta conté nombrosos grànuls secretors d'insulina, uns 13.000 en ratolí (Dean, 1973). Cada grànul conté unes 200.000 molècules d'insulina cristal·litzades amb àtoms de  $Zn^{+2}$ . Tan sols una petita proporció d'aquests grànuls participaran en l'alliberació de la insulina estimulada per glucosa.

#### 1.3.1. Secreció d'insulina estimulada per glucosa

La secreció d'insulina està altament regulada per diferents factors d'entre els quals la glucosa és el de major importància fisiològica. La metabolització de la glucosa és necessària tant per la síntesi com per la secreció de la insulina (Prentki et al., 1997).

La glucosa entra a la cèl·lula beta a través del transportador de glucosa GLUT-2, el qual es caracteritza per presentar una elevada capacitat de transport de glucosa i una baixa afinitat per aquest monosacàrid tal i com indica la seva  $K_m$  ( $K_m = 5 \text{ mM}$ ), amb un valor semblant a la concentració normal de glucosa en sang. Les característiques del transportador GLUT 2 permeten que les concentracions de glucosa intra- i extracel·lulars puguin arribar a equilibrar-se.

Un cop a l'interior de la cèl·lula la glucosa és fosforilada a glucosa 6-fosfat (G6P) per un isoenzim de l'hexoquinasa d'elevada  $K_m$ , i per tant de baixa afinitat: la glucoquinasa. La fosforilació de la glucosa a glucosa 6 fosfat (G6P) és el primer pas per la glucòlisi.

En les cèl·lules beta la glucòlisi dóna com a producte final el piruvat, i donat que la concentració de la lactat deshidrogenasa (LDH o LD), enzim que catalitza una reacció d'oxidació-reducció en la qual el piruvat és reduït a lactat gràcies a l'oxidació del NADH a  $NAD^+$ , és baixa en les cèl·lules beta, la conversió de piruvat a lactat en aquest tipus cel·lular és mínima. La lactat deshidrogenasa, essencial per l'oxidació del NADH generat per la glucòlisi, es troba compensada en les cèl·lules beta per transportadors de protons ancorats en la membrana mitocondrial (el transportador de glicerofosfat i el de malat/aspartat). El transportador malat/aspartat passa els electrons NADH de la glucòlisi citosòlica al malat el qual serà reoxidat a oxalacetat en la matriu mitocondrial. El bloqueig d'ambdós transportadors inhibeix la secreció d'insulina induïda per glucosa (Eto et al., 1999). L'estreta dependència entre la

secreció i els transportadors explica la coordinació entre la glucòlisi i el metabolisme mitocondrial en les cèl·lules beta (Newgard and McGarry, 1995).

En el mitocondri el piruvat es converteix bé a acetilCoA (acetilcoenzim A), per acció de la piruvat deshidrogenasa, bé a oxalacetat, mitjançant la piruvat carboxilasa, i s'inicia el cicle de Krebs. En el cicle de Krebs es generen equivalents reduïts NADH i FADH<sub>2</sub> que transfereixen electrons a la cadena respiratòria provocant un increment en el potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ), aquesta hiperpolarització estimula l'entrada de Ca<sup>2+</sup>. Els nivells de Ca<sup>2+</sup> són suficients per activar les deshidrogenases generadores de NADH (Rutter et al., 1996). D'aquesta manera l'augment de Ca<sup>2+</sup> en el citosol durant l'estimulació de la secreció d'insulina per glucosa es transfereix al mitocondri facilitant la producció de NADH i altres factors que participen en l'estimulació (Maechler et al., 2006).

L'ATP format a partir de la fosforilació oxidativa, passa al citosol. La major part de l'ATP té la funció de mantenir l'homeòstasi iònica de la cèl·lula, ja que l'entrada i sortida de ions està controlada per bombes iòniques que consumeixen ATP o bé per ATPases. L'ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> controla el gradient de ions de sodi (Na<sup>+</sup>) (10 vegades inferior a l'espai intracel·lular) i ions de potassi (K<sup>+</sup>) (20 vegades superior a l'espai intracel·lular). Aquesta bomba s'encarrega de restablir l'equilibri inicial després d'un potencial d'acció.

La membrana plasmàtica de la cèl·lula beta en dejú es troba polaritzada (-70 mV, potencial negatiu en l'interior). Aquest estat es manté per la sortida de K<sup>+</sup> a través del canal de K<sup>+</sup> sensible a ATP (K<sub>ATP</sub>). Aquest canal està format per les subunitats kir6.2 amb receptors sulfonilureas i SUR1. Quan incrementa la concentració de glucosa intracel·lular, augmenta la relació ATP/ADP degut a l'increment d'ATP generat en la fosforilació oxidativa, fet que provoca el tancament del canal K<sub>ATP</sub> i la despolarització de la membrana plasmàtica. Les sulfonilureas (fàrmacs hipoglucemiats) imiten aquest procés unint-se a SUR1 i provocant el tancament del canal, pel contrari el diazòxid (amb acció hipergluciamant) inhibeix aquest procés obrint els canals K<sub>ATP</sub> (Miki et al., 1999).

El tancament de K<sub>ATP</sub> és clau perquè es produeixi l'augment citosòlic de Ca<sup>2+</sup> ja que la despolarització de la membrana estimula l'obertura dels canals de Ca<sup>2+</sup> dependents de voltatge, actius quan el potencial de membrana es situa entre -40 i 0 mV. Els patrons globals del potencial de membrana, del Ca<sup>2+</sup> citosòlic i de la secreció tenen una resposta bifàsica a

l'estimulació de glucosa, amb una primera fase transitòria que dura pocs minuts i una segona fase sostinguda (Bergsten, 1995). El bloqueig dels canals de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipus L suprimeix ambdues fases de la secreció mentre que, l'estimulació d'aquests l'augmenta, indicant la importància de l'augment de  $\text{Ca}^{2+}$  en el procés de la secreció (Fig. 3).

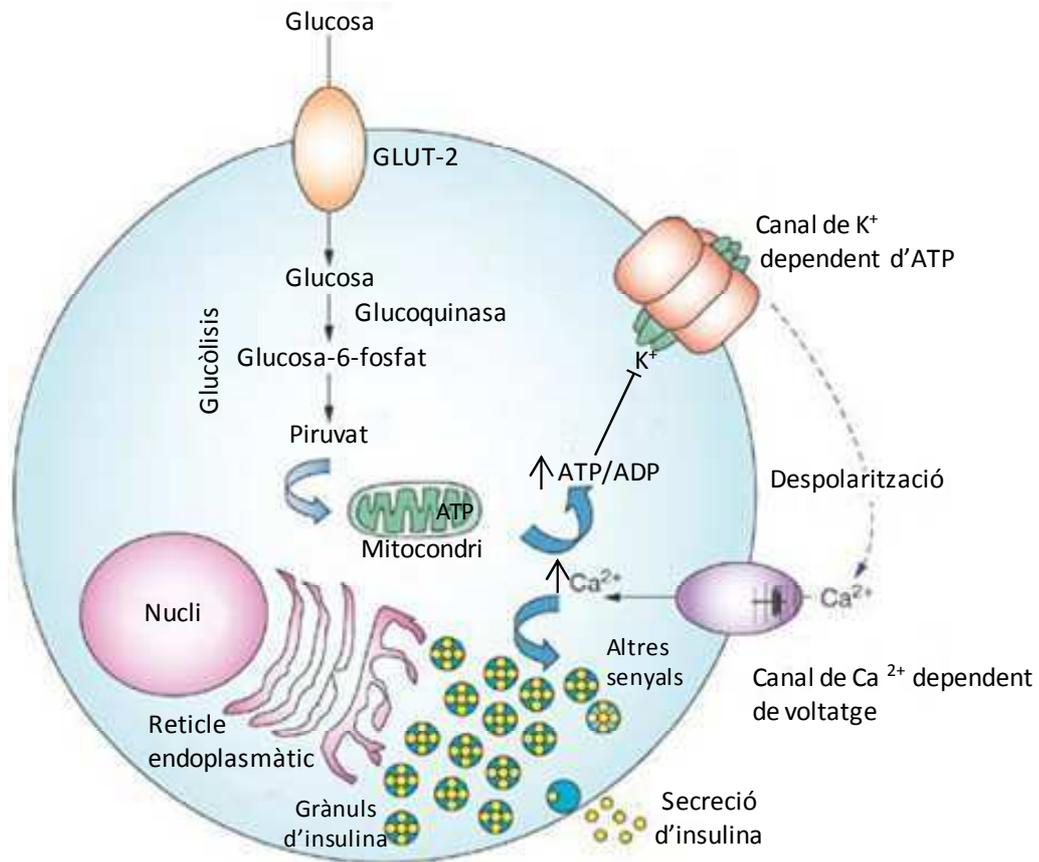


Figura 3. Esquema de la secreció d'insulina. Modificat de (De León and Stanley, 2007).

## 2. REGULACIÓ DE LA MASSA CEL·LULAR BETA

La concepció de la capacitat d'adaptació del pàncrees endocrí ha canviat radicalment en els últims anys, de ser considerat un òrgan estàtic a definir-se com a un òrgan dinàmic i plàstic. La plasticitat endocrina es pot definir com la capacitat que té l'òrgan per regular la massa cel·lular beta en funció de les necessitats d'insulina per tal de poder garantir un òptim control de la glucèmia. Aquesta plasticitat cel·lular implica, per una banda l'expansió, i per l'altra la disminució de la massa beta. Així doncs, el pàncrees endocrí es troba en constant remodelació mitjançant un procés dinàmic en el que participen tant la regeneració com la mort cel·lular. Diversos factors de tipus genètic, metabòlic i ambiental participen d'aquest procés de remodelació. El balanç entre els diferents mecanismes que controlen la massa beta permeten l'adaptació d'aquesta a les variacions de la demanda metabòlica de l'organisme al llarg de la vida. Els mecanismes d'adaptació de la massa beta no són excloents i poden donar-se de manera simultània. L'expansió i la involució de la massa beta poden venir determinades tant pel canvi en el número de cèl·lules com per la modificació de la seva mida mitjançant l'augment (hipertròfia) o la disminució (atrofia) del volum cel·lular (Montanya and Téllez, 2009).

### 2.1. Canvis en el nombre de les cèl·lules beta

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

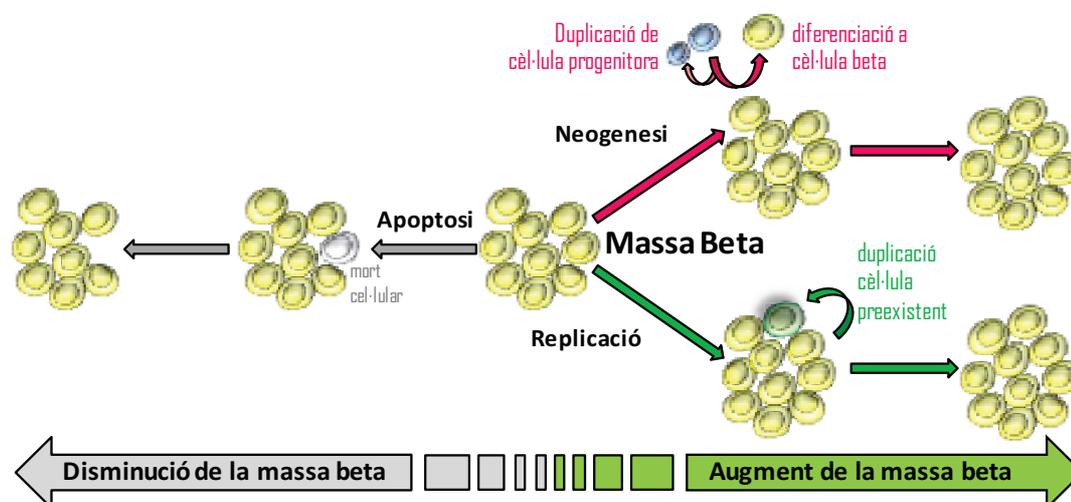


Figura 4. Representació esquemàtica de l'equilibri dinàmic de la massa beta.

Els dos mecanismes que determinen l'augment del nombre absolut de cèl·lules beta són la neogènesi i la replicació (Bonner-Weir and Weir, 2005) (Fig. 4).

### 2.1.1. Neogènesi

La neogènesi és el procés de formació de noves cèl·lules beta a partir de precursors no endocrins; pel que es requereix en primer lloc, la proliferació d'aquests precursors i en segon lloc, una posterior diferenciació dels precursors cap a cèl·lules beta productores d'insulina.

Durant el desenvolupament embrionari l'expansió de la massa cel·lular beta es dona principalment per neogènesi, en canvi, en el pàncrees adult es considera que la neogènesi generalment es dona en baixa freqüència, però podria augmentar en casos de pèrdua d'una part important de la massa beta.

En el pàncrees adult la naturalesa dels precursors no ha estat determinada de manera inequívoca, tot i que existeixen diversos estudis que suggereixen que es podrien trobar en els ductes pancreàtics i serien d'origen epitelial (Suzuki et al., 2004).

En l'estudi de la regeneració endocrina del pàncrees els models *in vivo* més utilitzats han estat el de l'obstrucció ductal i el de la pancreatectomia subtotal. Ambdós models resulten en un increment de la massa de cèl·lules beta. L'aparició de petites agrupacions de cèl·lules beta escampades per la porció exocrina del pàncrees, d'illots en contacte amb els ductes i de cèl·lules ductals expressant insulina han portat a reforçar la hipòtesi de que cèl·lules ductals adultes poden considerar-se cèl·lules progenitores endocrines (Bonner-Weir et al., 1993; Rosenberg et al., 1983; Wang et al., 1995).

Tant en el model d'obstrucció ductal com en el de la pancreatectomia subtotal es dona un increment del nombre de cèl·lules amb fenotip ductal que es troben formant complexos tubulars, i s'ha hipotetitzat que aquestes cèl·lules amb fenotip ductal podrien contenir cèl·lules mare multipotents (Sharma et al., 1999; Wang et al., 1995). Per tant, l'administració de molècules amb accions mitogèniques, com són l'EGF, la gastrina o els anàlegs del GLP-1 als animals sotmesos a lesió pancreàtica, potencia l'increment de l'expansió de la massa beta (Rooman and Bouwens, 2004; Téllez et al., 2011; Xu et al., 2006; Xu et al., 1999). S'ha proposat que l'increment de la massa beta vindria donat, principalment, per la diferenciació de cèl·lules

amb fenotip ductal que actuarien com a progenitors de les cèl·lules endocrines (Rooman et al., 2002).

En l'actualitat les tècniques de marcatge genètic induïble han permès estudiar d'una manera més precisa l'origen de les cèl·lules beta que es generen després de la lesió del pàncrees. Tot i que aquesta tècnica ha representat un gran avenç, convé recalcar que, l'elecció del gen usat per marcar la potencial cèl·lula progenitora és determinant pel resultat de la investigació. Aquest fet es pot exemplificar amb dos treballs rellevants que utilitzen el mateix model de lesió pancreàtica, l'obstrucció ductal, però que parteixen del marcatge de gens diferents i obtenen resultats discrepants. En el primer treball, realitzat pel grup de Bonner-Weir es descriu, mitjançant el marcatge genètic de les cèl·lules ductals utilitzant el promotor del gen de l'anhidrasa carbònica, que aquestes cèl·lules actuen com a progenitores de les cèl·lules tant endocrines com exocrines del pàncrees de ratolí adult (Inada et al., 2008). Posteriorment, el grup de Ferrer, en un altre estudi de marcatge genètic de les cèl·lules ductals, aquesta vegada utilitzant el promotor del gen que codifica pel  $hnf-1\beta$  (factor nuclear hepàtic  $1\beta$ ), va determinar que en el pàncrees de ratolí adult, les cèl·lules ductals donen lloc, exclusivament, a cèl·lules ductals (Solar et al., 2009). A més, aquest estudi, va posar en entredit l'existència de fenòmens de transdiferenciació acino-ductal que s'havien proposat anteriorment (Lardon et al., 2004; Rooman et al., 2000; Rooman et al., 2002).

Donant suport a l'existència de cèl·lules precursors en l'epiteli ductal del pàncrees adult danyat, un altre treball confirmava la presència de cèl·lules Neurogenina 3 positives ( $Ngn3^+$ ) en l'epiteli ductal de pàncrees de ratolí adult, i mostrava com aquestes cèl·lules tenien la capacitat de diferenciar-se a cèl·lules beta en un cultiu d'explants pancreàtics embrionaris (Xu et al., 2008). Cal remarcar que la reaparició de l'expressió del factor de transcripció  $Ngn3$  després del dany induït per obstrucció ductal és clau, ja que es considera que una cèl·lula que expressa  $Ngn3$ , regulador mestre de la formació de les cèl·lules endocrines, és una cèl·lula progenitora de les cèl·lules endocrines de l'illot (Gu et al., 2002).

La hipòtesi de les cèl·lules ductals adultes com a possibles progenitores de les cèl·lules pancreàtiques està recolzada per un elevat nombre d'estudis, però no exclou la possibilitat de que altres tipus cel·lulars pancreàtics puguin actuar com a progenitors de les cèl·lules beta. A tall d'exemple, la reprogramació de les cèl·lules acinars, per mitjà de la modificació genètica d'aquestes *in vivo*, es va demostrar en un estudi on es va corroborar la diferenciació de les

cèl·lules acinars cap a un fenotip beta (Zhou et al., 2008). En aquest estudi es va injectar una barreja de 3 vectors d'expressió que codificaven pels gens Ngn3, Pdx-1 i MafA, i que tenien com a diana les cèl·lules dels acinis pancreàtics, directament en la regió del pàncrees esplènic dels ratolins. Deu dies després de la transferència gènica es va observar l'aparició de noves cèl·lules beta en la zona tractada del pàncrees, confirmant que les cèl·lules acinars adultes es poden reprogramar per donar lloc a cèl·lules beta *in vivo*.

Altrament, alguns estudis han evidenciat la presència de cèl·lules progenitores formant part dels propis illots pancreàtic i han mostrat que aquestes cèl·lules, en determinades situacions com l'edat o el dany pancreàtic, poden donar lloc a cèl·lules productores d'insulina (Liu et al., 2010). La naturalesa d'aquestes cèl·lules, però, és encara desconeguda. D'altra banda, també s'ha demostrat *in vivo* que les cèl·lules alfa poden transdiferenciar-se cap a cèl·lules beta (Thorel et al., 2010). En aquest estudi, es va emprar la tècnica d'eliminació cel·lular per determinació genètica combinada amb el marcatge genètic. L'eliminació de les cèl·lules beta pancreàtiques es va portar a terme mitjançant l'expressió del receptor de la toxina diftèrica sota el promotor de la insulina, per tant, al administrar la toxina diftèrica als ratolins, es provoca la mort selectiva per apoptosi de les cèl·lules beta pancreàtiques. Amb aquest mètode els autors aconseguen la desaparició del 99% de les cèl·lules beta pancreàtiques i d'aquesta manera, amb la destrucció pràcticament total de les cèl·lules beta, poder estudiar quines cèl·lules són les responsables de la regeneració de la massa cel·lular beta. En aquest cas, els autors proposen les cèl·lules alfa com a cèl·lules progenitores de les cèl·lules beta. Per poder confirmar la seva hipòtesi utilitzen el promotor del glucagó per marcar les cèl·lules alfa, i poder seguir-les en el procés de regeneració de la massa beta. Finalment, creuant aquests dos ratolins i administrant la toxina diftèrica observen que les cèl·lules alfa poden donar lloc a noves cèl·lules beta en situacions de destrucció massiva de la massa beta pancreàtica.

En definitiva, a la controvèrsia existent sobre la naturalesa dels precursors de les cèl·lules endocrines del pàncrees cal afegir el desconeixement de la importància relativa de la neogènesi en els organismes adults, és a dir, si la formació de cèl·lules beta a partir de precursors contribueix de manera significativa al manteniment de la massa beta en l'edat adulta.

### 2.1.2. Replicació

La replicació consisteix en la divisió d'una cèl·lula per obtenir dues noves cèl·lules. Històricament es pensava que les cèl·lules beta pancreàtiques eren cèl·lules totalment diferenciades que no tenien la capacitat de proliferar. Aquesta idea va quedar obsoleta quan en diversos estudis es va demostrar que les cèl·lules beta podien replicar en resposta a diferents estímuls, tant fisiològics, com experimentals, estímuls tals com l'embaràs, l'alimentació hipercalòrica, la pancreatectomia o la hiperglucèmia.

La capacitat replicativa de les cèl·lules beta humanes disminueix durant els primers anys de vida, i a partir dels 20-30 anys es veu clarament reduïda (Cnop et al., 2010; Meier et al., 2008; Perl et al., 2010) malgrat pugui estar sotmesa a variacions en funció de la demanda metabòlica (Bonner-Weir et al., 1989; Montaña et al., 1994) per tal de garantir un bon control glucèmic en situacions extraordinàries. En els rosegadors s'observa el mateix fenomen, durant el primer mes de vida les cèl·lules beta presenten nivells de replicació més elevats que van disminuint paulatinament fins els 12 mesos d'edat moment en el qual resulten significativament inferiors (Maedler et al., 2006b; Montanya et al., 2000; Parnaud et al., 2008; Teta et al., 2005).

S'ha postulat que en l'illot existeixen diferents tipus de cèl·lula beta: el pool replicatiu i el pool senescent. El primer inclouria les cèl·lules beta capaces de dividir-se per mitosi en resposta a diferents factors de creixement; el segon estaria compost per aquelles cèl·lules beta funcionals incapaces de replicar (Fellous et al., 2007; Gershengorn et al., 2004). Ara bé, aquesta teoria ha estat posteriorment refutada en estudis on es demostra que, en ratolins adults, totes les cèl·lules beta comparteixen aquesta capacitat replicativa, i per tant, participen de forma equitativa en el manteniment de la massa cel·lular beta (Brennand et al., 2007).

#### 2.1.2.1. Cicle cel·lular de les cèl·lules beta

La replicació de les cèl·lules beta depèn de l'estricta control de l'entrada, la progressió i la sortida del cicle cel·lular.

I. Swenne i C. Hellerström van ser els pioners en l'estudi del cicle cel·lular de les cèl·lules beta. Basant-se en estudis realitzats amb illots fetals de rata en cultiu sotmesos a diferents concentracions de glucosa (Swenne, 1982), Swenne va proposar la durada del cicle cel·lular de

les cèl·lules beta: fase G1 (2.5 hores), fase S (6.4 hores), fase G2 (5.5 hores) i fase M (0.5 hores), sent la durada total del cicle de 14.9 hores (Swenne, 1982). Amb aquests estudis també es va postular que la glucosa estimulava la proliferació de les cèl·lules beta promovent l'entrada en cicle.

A part de la glucosa, d'entre els diferents estímuls que indueixen la replicació de les cèl·lules beta són també de destacar el factor de creixement d'hepatòcits (HGF), l'hormona del creixement (GH), la prolactina (PRL) i el lactogen placentari (PL), la betacel·lulina, el pèptid similar al glucagó 1 (GLP-1) i els seus anàlegs i els factors de creixement similars a la insulina (IGFs), entre molts d'altres.

L'HGF és un factor de creixement mesenquimàtic que es va descriure com una molècula circulant implicada en la regeneració hepàtica. Tant l'HGF com el seu receptor (receptor tirosina quinasa codificat pel proto-oncogen c-met) s'expressen en els illots pancreàtics de diverses espècies. HGF actua com a agent mitogènic i insulinoatròpic en cèl·lules d'illots fetals i adults (Otonkoski et al., 1994; Otonkoski et al., 1996).

La GH, la PRL i el PL pertanyen a una família d'hormones que juguen un paper important en l'augment de la massa beta que es dona durant els períodes de l'embaràs i l'alletament, i han estat extensament estudiades pel que fa el seu efecte mitogènic en les cèl·lules beta pancreàtiques, a més s'ha demostrat la capacitat de la GH per estimular la replicació de les cèl·lules beta en illots fetals, neonatals i adults (Billestrup and Nielsen, 1991; Sjöholm, 1992; Sjöholm et al., 1990).

La betacel·lulina és un pèptid que pertany a la família dels factors de creixement epidèrmics (EGFs). Es troba en la membrana plasmàtica de les cèl·lules beta i s'activa mitjançant la proteòlisis de la part extracel·lular, la proteïna activa és lligand pel receptors EGF. El seu efecte mitogènic ha estat demostrat en cèl·lules d'insulinoma de rata (Huotari et al., 1998).

El pèptid similar al glucagó (GLP-1) és una hormona incretina sintetitzada i secretada per les cèl·lules L de l'intestí que promou la biosíntesi i la secreció d'insulina. Els seus efectes com a potent estimulador de la proliferació de les cèl·lules beta han estat àmpliament revisats (Doyle and Egan, 2007; Perfetti and Hui, 2004; Stoffers, 2004). A més el GLP-1 inhibeix la secreció de glucagó i disminueix l'apoptosi. La vida mitja circulat del GLP-1 és molt curta degut a la ràpida inactivació per la dipeptidil-peptidasa- IV i l'aclariment renal. L'exendina-4 (Ex-4) és un agonista

del GLP-1R resistent a la degradació per la dipeptidil-peptidasa-IV i que, per tant, té una vida mitja *in vivo* molt més llarga. Estudis realitzats en rates demostren que l'administració d'exendina-4 provoca un increment del 200% de la massa insular (Greig et al., 1999) mitjançant l'augment de la replicació i de la neogènesi (Xu et al., 1999).

Els factors de creixement similars a la insulina són polipèptids que exerceixen accions de forma paracrina i autocrina regulant l'estimulació del creixement, promovent la diferenciació i la proliferació cel·lular i actuant com a factors de supervivència limitant l'apoptosi en diferents tipus cel·lulars. Les diverses accions dels IGFs es tractaran en detall en l'apartat 6 d'aquesta introducció.

### 2.1.3. Mort cel·lular

L'augment de la massa cel·lular beta produït per la neogènesi o la replicació pot ser contrarestat per la disminució del número de cèl·lules mitjançant la mort cel·lular. La mort cel·lular és un procés indispensable pel manteniment i regeneració de qualsevol teixit. La contribució relativa dels diferents mecanismes d'expansió i involució poden variar de manera considerable, inclús en un mateix individu, quan canvien les condicions fisiològiques.

Clàssicament s'han descrit dos mecanismes diferenciats de mort cel·lular, un d'actiu i programat, que comporta despesa d'energia, denominat apoptosi, i un de passiu anomenat necrosi. Ambdós mecanismes poden donar-se simultàniament en el mateix teixit i serà la intensitat i la durada de l'estímul el que determinarà a la cèl·lula a morir per apoptosi o per necrosi.

#### 2.1.3.1. Apoptosi

La mort cel·lular per apoptosi és un procés ràpid, controlat genèticament, que requereix consum energètic i que implica síntesi de *novo* de diferents proteïnes. El procés comporta una regulació molt precisa i es caracteritza per un seguit de canvis bioquímics i morfològics. Afecta a la cèl·lula individualment i s'acostuma a denominar "suïcidi cel·lular".

L'apoptosi o mort cel·lular programada permet modelar el teixit pancreàtic durant l'organogènesi i la vida de l'individu, a part de jugar un paper fonamental durant l'expansió i posterior involució de la massa cel·lular beta en la diabetis tipus 2.

L'apoptosi es pot dividir en tres fases en funció dels canvis morfològics que experimenta la cèl·lula (Fig. 5).

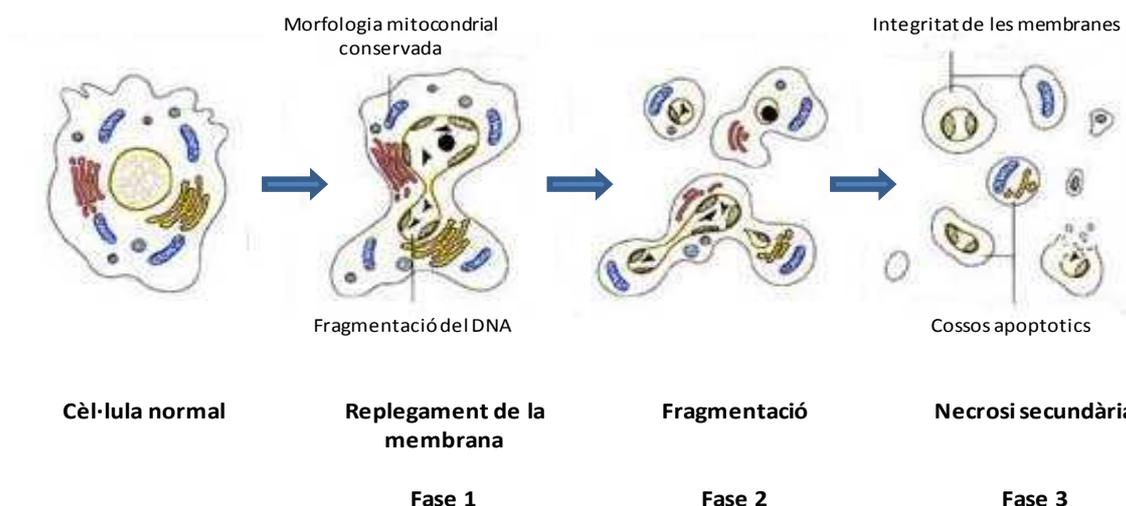


Figura 5. Esquema del procés de mort cel·lular per apoptosi. Modificat del càtalog de Roche ([www.roche.com](http://www.roche.com)).

En la primera fase es produeix la condensació i fragmentació del DNA, que s'acumula a la perifèria del nucli i provoca la reducció de la mida nuclear. La fragmentació del DNA és el paràmetre que es detecta en la tècnica del TUNEL, tècnica àmplia i habitualment utilitzada per la quantificació de l'apoptosi. També es redueix el volum total cel·lular i en conseqüència augmenta la densitat, es dona la compactació dels orgànuls citoplasmàtics i la dilatació del reticle endoplasmàtic. En aquesta primera fase de l'apoptosi l'estructura del mitocondri es manté inalterada.

En la segona fase del procés, que es pot solapar amb l'anterior, la membrana citoplasmàtica perd la seva estructura, es replega formant invaginacions, fenomen anomenat "blebbing", aquestes invaginacions s'acabaran tancant i donant lloc a la formació de vesícules que contindran fragments cel·lulars: els cossos apoptòtics. Els cossos apoptòtics seran fagocitats per cèl·lules veïnes, generalment macròfags per evitar la resposta inflamatòria. En el moment

del “blebbing” es dona també la translocació de la fosfatidilserina, fosfolípid apolar que es troba en la part interna de la membrana plasmàtica. L'exposició de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana pot ser detectada per la unió específica de la proteïna anexina V, utilitzada habitualment per la detecció de l'apoptosi primerenca mitjançant citometria de flux.

En la tercera fase es dona la degeneració de les estructures citoplasmàtiques i nuclears residuals. Aquest procés recorda les característiques pròpies de la mort per necrosi, pel que es coneix com a necrosi secundària.

Existeixen gran varietat de factors que poden activar l'apoptosi, per exemple diferents productes químics (radicals lliures d'oxigen, fàrmacs...), factors que provoquen dany físic a la cèl·lula (raig X, xoc tèrmic), atac d'altres cèl·lules (cèl·lules T), citocines (TNF- $\alpha$ ), pèrdua de factors tròfics (hormones, IL-2, IL-3) o pèrdua del contacte amb la matriu extracel·lular (procés conegut com a anoikis).

#### 2.1.3.2. Necrosi

La necrosi es la mort accidental que provoca la destrucció no controlada de les cèl·lules degut a un dany sever i sobtat que pot afectar a un conjunt de cèl·lules o a una zona àmplia de teixit. La necrosi es caracteritza per canvis irreversibles tant en el nucli com en el citoplasma de la cèl·lula, aquests canvis incapaciten el manteniment de l'homeòstasi cel·lular (Fig. 6).

Els primers canvis es donen a nivell mitocondrial, augmenta la permeabilitat dels mitocondris que s'inflen i es formen dipòsits de lipoproteïnes en la matriu mitocondrial. Posteriorment la membrana plasmàtica perd la capacitat per regular la pressió osmòtica, provocant l'alteració del balanç de sodi, calci i aigua. 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, com a conseqüència d'aquestes alteracions el volum cel·lular augmenta desmesuradament i entra en xoc osmòtic (Gores et al., 1990). L'acidosi que es deriva del xoc osmòtic provoca la precipitació de la cromatina. Finalment els lisosomes i el reticle endoplasmàtic també s'inflen i exploten alliberant enzims digestius que indueixen la destrucció autolítica de la cèl·lula. La ruptura de la membrana fa que

el contingut intracel·lular sigui alliberat a l'espai extracel·lular provocant una resposta inflamatòria.

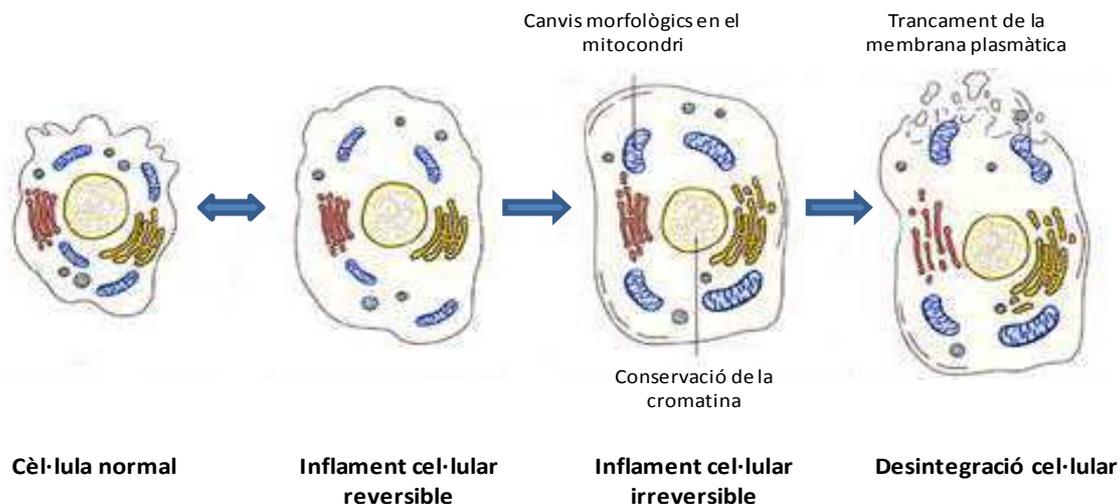


Figura 6. Esquema del procés de mort cel·lular per necrosi. Modificat del càtalog de Roche (www.roche.com).

Els factors que poden desencadenar el procés necròtic són diversos, d'entre els quals trobem la hipòxia greu, la isquèmia, diferents factors que danyen la membrana cel·lular com són determinades toxines, un trauma del teixit, tòxics químics, espècies reactives d'oxigen o inhibidors de les bombes iòniques.

Els processos de mort són importants pel manteniment de l'equilibri dinàmic de la massa beta, al igual que la replicació i la neogènesi. En el moment en que es dona un desajust entre aquests processos augmentant la taxa de mort cel·lular en detriment de la proliferació i de la neogènesi, es produirà una reducció de la massa beta, fet que desencadenarà la intolerància a la glucosa i l'hiperglucèmia.

## 2.2. Canvis en la mida de les cèl·lules beta

La regulació de la massa beta per canvis en la mida de les cèl·lules beta és un mecanisme acceptat malgrat no estigui ben caracteritzat.

Sembla que un augment en la demanda metabòlica podria portar a un increment del volum de les cèl·lules beta que, conjuntament amb l'augment de la replicació, resultaria en l'augment de la massa beta.

Estudis realitzats en models animals posen de manifest que la mida individual de les cèl·lules beta augmenta des del primer mes de vida fins al setè, moment en que s'estabilitza per augmentar novament a partir del quinzè mes (Montanya et al., 2000).

L'embaràs és una situació fisiològica de regulació de la massa beta en el que han estat descrits canvis en la mida de les cèl·lules beta. Durant la gestació els illots de la mare s'adapten a la nova demanda metabòlica augmentant tant la replicació com la mida de les cèl·lules beta, i sembla que el lactogen placentari podria tenir un paper important en aquests canvis (Parsons et al., 1995; Parsons et al., 1992). L'augment de la massa beta disminueix durant els 10 dies posteriors al part, moment en el que es dona un augment de l'apoptosi de les cèl·lules beta que permet el restabliment de la massa beta normal (Scaglia et al., 1995).

Els mecanismes que porten a l'increment de la mida cel·lular no són ben coneguts, però alguns estudis suggereixen que la proteïna Akt podria estar-hi implicada, ja que s'ha descrit que la seva sobreexpressió, de forma constitutiva, promou un augment de la mida de les cèl·lules beta en ratolins (Bernal-Mizrachi et al., 2001; Tuttle et al., 2001). Més recentment també s'ha descrit que Akt indueix hipertròfia mitjançant l'activació i inactivació de les quinases Serina/Threonina mTOR i GSK-3 (Dickson and Rhodes, 2004).

També ha estat descrit el paper de la S6K1, quinasa efectora de la via de senyalització PI3K, en el control de la mida de les cèl·lules beta (Pende et al., 2000). Pende i col·laboradors mostren que ratolins deficients per la quinasa S6K1 són intolerants a la glucosa i hipoinsulinèmics. La resistència a la insulina no s'observa en múscul aïllat, per tant la forta reducció en la secreció d'insulina estimulada per glucosa i en el contingut d'insulina que presenten aquests ratolins, no és deguda a la fallada en la detecció o la secreció de la insulina sinó a una reducció de la massa beta pancreàtica, que s'explica per una disminució selectiva en la mida de les cèl·lules beta.

### 3. DIABETIS MELLITUS

La primera referència històrica de la malaltia es troba en el Papir d'Ebers, un dels tractats mèdics més antics que es coneixen. El Papir d'Ebers fou redactat en l'antic Egipte l'any 1550 aC, i s'hi descriu amb precisió un quadre clínic que avui anomenem diabetis, terme utilitzat per primera vegada pels grecs el segle I dC i que fa referència a la contínua pèrdua de líquid en forma de grans quantitats d'orina (poliúria) que caracteritza aquest trastorn. Posteriorment, en el segle setze es va afegir al terme diabetis l'adjectiu mellitus (provinent de la mateixa arrel llatina de la paraula mel), que assenyalava la dolçor, deguda a l'alt contingut en glucosa, de l'orina d'aquests malalts.

La diabetis mellitus (DM) és una síndrome heterogènia, que presenta com a tret primari comú la presència d'hiperglucèmia. Sota el terme diabetis s'inclouen un grup de malalties que es desencadenen per defectes en la secreció d'insulina, en l'augment de la resistència a la seva acció o per ambdues causes, donant com a conseqüència la presència de nivells de glucosa en sang anormalment elevats i trastorns en el metabolisme lipídic i proteic.

Diferents processos patogènics poden estar implicats en el desenvolupament de la malaltia. D'una banda, processos de naturalesa autoimmunitària contra les cèl·lules beta del pàncrees que porten a la seva destrucció i donen lloc a la deficiència d'insulina. D'una altra, anomalies produïdes tant en les cèl·lules productores d'insulina com en les cèl·lules diana de l'hormona, especialment en múscul esquelètic, fetge i teixit adipós, que es traduiran en l'aparició de la resistència a l'acció de la insulina.

La hiperglucèmia està associada tant a l'aparició dels símptomes clínics característics de la malaltia com en el desenvolupament de complicacions secundàries a llarg termini. Els símptomes més característics de la diabetis mellitus són la poliúria, la polidípsia, la pèrdua de pes i en algunes ocasions la polifàgia i la visió borrosa i, en els casos més severos també es pot presentar cetoàcidosi o la síndrome hiperosmolar no cetònica, que sense un tractament adequat porten a la mort del pacient. La hiperglucèmia crònica afecta nombrosos sistemes i òrgans, de forma que les complicacions a llarg termini de la diabetis són molt diverses. Algunes d'elles són la retinopatia, amb potencial pèrdua de la visió, la nefropatia, amb possibilitat de fallada renal i la neuropatia perifèrica. Els pacients diabètics també presenten una elevada incidència d'arteriosclerosi amb complicacions macrovasculars entre les quals trobem malalties

coronaries i vasculopaties en les extremitats inferiors així com un augment del risc de mort cardiovascular que es situa entre el 100 i el 400%.

Aquestes complicacions causen una gran morbiditat i generen també importants despeses sanitàries. Segons dades de la Federació Internacional de la Diabetis (IDF), el 2013 el dispendi atribuïble a la diabetis va ser de 548 billons de dòlars.

En les últimes dècades la prevalença de la diabetis ha augmentat de forma alarmant fins a convertir-se en un greu problema de salut mundial. Les dades de la Federació Internacional de Diabetis (IDF) del 2013 indiquen que en el món hi ha més de 382 milions de persones amb diabetis, un 8.3% de la població adulta, i el nombre de persones afectades per la malaltia va en augment en els diferents països. El 2013 van morir 5.1 milions de persones a causa de la diabetis i la meitat d'aquestes morts va ser de persones menors de 60 anys. Convé subratllat que el 80% de les persones amb diabetis viuen en països amb rentes baixes i mitges i un 46% de les persones amb la malaltia no són conscients de la seva condició. En darrer terme, i segons les darreres estimacions, es calcula que si aquesta tendència creixent continua, el nombre de persones afectades arribarà als 592 milions en menys de 25 anys. El fet que actualment 175 milions de casos no estiguin diagnosticats implica que una gran quantitat de persones amb diabetis desenvolupin de manera progressiva complicacions de les que no són conscients, a més amb el 80% del número total d'afectats en els països amb ingressos mitjos i baixos, on l'epidèmia s'accelera a un ritme alarmant, les dades de la IDF proporcionen una indicació preocupant de l'impacte futur de la diabetis com una de les principals amenaces pel desenvolupament mundial. En definitiva, aquestes dades fan palesa la magnitud del problema sanitari que representa la diabetis i la gran necessitat de cercar les millors estratègies per prevenir-la i tractar-la.

### **3.1. Classificació de la diabetis mellitus**

La classificació vigent (American Diabetes Association, ADA 2013) dels diferents tipus de diabetis inclou quatre categories:

**La diabetis tipus 1 (DM1)** és una malaltia causada per la destrucció autoimmunitària de les cèl·lules beta del pàncrees. Representa aproximadament un 10% dels pacients diabètics i normalment

apareix en nens i adolescents. El dèficit quasi absolut de la insulina endògena és el que provoca la hiperglucèmia i la causa per la qual aquests pacients requereixen de l'administració d'insulina exògena per sobreviure, és per aquest motiu que en el passat la DM1 va rebre el nom de "diabetis insulino-dependent" o "diabetis juvenil". Actualment s'ha abandonat aquesta nomenclatura degut a que aquestes característiques no són exclusives de la DM1.

**La diabetis tipus 2 (DM2)** és una malaltia multifactorial causada per una resistència a l'acció de la insulina en els teixits perifèrics (múscul, fetge i teixit adipós) i a una inadequada secreció d'aquesta, juntament amb una disminució de la funcionalitat i la massa de les cèl·lules beta. Engloba entre el 90 i el 95% dels pacients diabètics i bàsicament es presenta en l'adult. Els diabètics de tipus 2 poden regular els nivells de glucosa per mitjà d'intervencions en el seu estil de vida (control de la dieta i exercici físic) associades a l'administració de fàrmacs hipoglucemians. Anteriorment la DM2 es coneixia com a "diabetis no insulino-dependent" o "diabetis de l'adult", però aquesta nomenclatura també va ser substituïda ja que la DM2 no és totalment independent de la insulina, un nombre significatiu de pacients amb diabetis tipus 2 requereix, de manera puntual o crònica, l'administració d'insulina exògena i, tot i ser més comú en adults, en l'actualitat també es presenta en infants i joves.

**Els tipus específics de diabetis** estan causats per defectes perfectament definits o presenten trets molt característics que permeten la seva clara identificació. Aquesta categoria engloba les formes de diabetis causades per defectes monogènics en la funció de la cèl·lula beta, que es coneixen amb el nom de MODY (maturity-onset diabetes of the young), o per defectes genètics en l'acció de la insulina, on es troba afectat el receptor de la insulina o les molècules que formen part de la seva via de senyalització. També formen part d'aquest grup certs tipus de diabetis que són induïts per infeccions, fàrmacs o tòxics o bé que la seva aparició és secundària a la presència d'altres malalties, com malalties del pàncrees exocrí, endocrinopaties (acromegàlia, síndrome de Cushing, hipertiroidisme, etc.) o síndromes genètiques (síndrome de Down, de Klinefelter, de Turner, atàxia de Friedreich, etc.).

**La diabetis gestacional** es defineix com a qualsevol hiperglucèmia o grau d'intolerància a la glucosa que apareix o es detecta en el període gestacional.

### 3.2. Diabetis Mellitus tipus 1

La diabetis tipus 1 (DM1) és una malaltia autoimmunitària que afecta selectivament les cèl·lules beta pancreàtiques productores d'insulina. La destrucció de les cèl·lules beta porta a l'insulino-dependència de l'individu afectat.

La DM1 s'associa a la presència d'una autoimmunitat, de tipus humoral i cel·lular, contra els illots pancreàtics que estaria associada amb un defecte de la immunoregulació (Atkinson, 2005; Atkinson and Eisenbarth, 2001). Malgrat els avenços en la caracterització immunològica de la DM1, actualment es desconeix l'etiologia exacta i la patogènesi de la malaltia.

Es conegut, però, que la DM1 és una malaltia crònica que es desenvolupa en varies etapes que s'iniciarien amb una susceptibilitat genètica, seguida d'una fase d'autoimmunitat amb pèrdua de massa cel·lular beta però sense increment de la glucosa en sang, i una fase final on es dona la destrucció quasi total de la massa de cèl·lules beta que desemboca en la diabetis clínica.

El desencadenament de l'autoimmunitat contra les cèl·lules beta està causat, probablement, per factors ambientals que actuen quan existeix un context de predisposició genètica. Un cop activades, les cèl·lules immunes, envaeixen els illots i els seus efectes deleteris sobre les cèl·lules beta estan mediat via mecanismes com Fas/FasL, perforina/granzima, espècies reactives d'oxigen i nitrogen i citocines proinflamàtores. La unió de les citocines als seus receptors en les cèl·lules beta provoca l'activació de les MAPK i els factors de transcripció STAT-1 i NF- $\kappa$ B, provocant un empitjorament funcional, estrès del reticle endoplasmàtic i finalment l'apoptosi cel·lular.

#### 3.2.1. Factors implicats en l'atac autoimmune en la diabetis tipus 1

S'han descrit diversos gens associats amb el desenvolupament de la malaltia i, estudis en bessons monozigòtics demostren que els factors ambientals també hi participen. Per tant, factors ambientals activarien mecanismes autoimmunes en individus genèticament susceptibles (Haverkos, 1997; Zimmet et al., 2001).

### 3.2.1.1. Factors ambientals

Varies evidències suggereixen que els factors ambientals són importants en el desenvolupament de la malaltia ja que actuen sobre la penetrància dels gens de susceptibilitat:

·L'àrea geogràfica pot ser determinant en el grau d'incidència de la malaltia en poblacions relacionades amb un fons genètic similar (Zimmet et al., 2001).

·El grau de concordança en el desenvolupament de diabetis en bessons monozigots és d'aproximadament del 50% (Salveti et al., 2000).

·Els gens susceptibles, que predisposen a un risc elevat de desenvolupar la malaltia, com determinats haplotips de la regió HLA de classe II, no manifesten una penetrància del 100% dins la població afectada.

S'ha especulat molt sobre quins poden ser els factors ambientals que estan implicats en el desenvolupament de la DM1. D'entre els possibles candidats implicats en l'inici de l'atac autoimmune trobem: infeccions víriques i toxines (Andréoletti et al., 1997; Devendra et al., 2004), alguns antibiòtics (Myers et al., 2001), la dieta (Schrezenmeir and Jagla, 2000) i l'estrès (Zimmet et al., 2001).

*Infeccions virals:* Els virus poden causar la destrucció de la cèl·lula beta, bé mitjançant una interacció directa amb la pròpia cèl·lula beta, bé induint de forma indirecta un atac autoimmune. Aquest últim podria estar causat per diversos mecanismes, com són: (1) l'activació policlonal de limfòcits T, (2) l'existència d'una reacció creuada amb proteïnes cel·lulars en la resposta contra un antigen viral (molecular mimicry), (3) l'expressió de molècules de MHC en les cèl·lules diana, (4) l'expressió d'antígens amagats o la generació de neoantígens (Robles and Eisenbarth, 2001).

Alguns dels virus que s'han relacionat amb el desenvolupament de la diabetis són el virus de la rubèola congènita, els enterovirus com Cocsakie virus, els citomegalovirus, els retrovirus i el virus d'Epstein-Barr (EBV). En els darrers anys els enterovirus, virus comuns que normalment causen infeccions lleus que provoquen refredats, vòmits o diarrea, han generat major interès, ja que diferents estudis han apuntat aquests virus, amb tropisme específic pel pàncrees, com a possibles desencadenants de la DM1 (Yeung et al., 2011).

*Dieta:* Estudis epidemiològics en humans han associat un increment del risc de desenvolupar DM1 a la substitució prematura de la llet materna per llet de vaca dins els primers mesos de vida (Gerstein, 1994). S'ha suggerit que un elevat consum de llet de vaca durant la infància pot predisposar al nen a desenvolupar autoanticossos associats a la diabetis a la vegada que en promou la progressió (Virtanen et al., 1998). L'existència de certes regions d'homologia entre les proteïnes de la llet i els antígens de l'illot s'han relacionat amb el mecanisme a través del qual realitzarien el seu efecte immunològic. En el període neonatal, l'intestí pot ser permeable al pas d'antígens a la sang i induir la producció d'anticossos. Entre les diferents proteïnes de la llet, l'albumina sèrica bovina i la  $\beta$ -caseïna, podrien ser responsables del desenvolupament de DM1 en humans i ratolins (Schrezenmeir and Jagla, 2000).

La ingestió de nitrosamines i una disminució del consum de vitamina D són altres factors de la dieta relacionats amb la patogenicitat de la DM1. Les nitrosamines estan presents en el fum del tabac i en carns fumades; per altra banda, la vitamina D pot tenir un efecte modulador de la reactivitat del sistema immunitari (Gorus et al., 2001).

En l'actualitat s'està portant a terme un estudi anomenat BABYDIET, que té com objectiu principal determinar si la intervenció primària, a través de la introducció tardana del gluten a la dieta, és factible i pot reduir la incidència de l'autoimmunitat en familiars de primer grau de pacients diabètics tipus 1 (ClinicalTrials.gov Archive Site).

*Toxines:* Petites quantitats de bafilomycina A1 (BafA1) poden causar una reducció de la tolerància a la glucosa i una alteració dels illots pancreàtics en ratolins (Myers et al., 2001). BafA1 i les substàncies relacionades són produïdes per *Streptomyces*, grup de bacteries de les que s'aïlla la streptozotocina, que es troben de forma ubiqüa en la terra i són capaces d'infectar tubercles com patates o canya de sucre (Myers et al., 2001). Una exposició repetida a la toxina produïda per *Streptomyces* a través de la dieta podria ser diabetogènica en humans genèticament susceptibles.

*Estrès:* L'estrès té un efecte cooperant, més que promotor, en el desenvolupament de la malaltia. Presenta un efecte modular en el sistema immunitari i incrementa els nivells de glucosa en sang. L'augment de la glucèmia està produït per l'estimulació de l'alliberació d'hormones contrareguladores, així com la inducció de certa resistència a l'acció de la insulina (Surwit and Schneider, 1993).

### 3.2.1.2. Factors genètics

La DM1 és una malaltia poligènica, però no s'ha identificat cap variant al·lèlica que per si sola sigui capaç de causar la malaltia. Ara bé, s'han identificat diversos loci que s'associen a un major risc de desenvolupar DM1. Entre ells el locus de l'Human Leuckocyte Antigen (HLA) és el principal polimorfisme de predisposició. El súper locus HLA conté gens que codifiquen per les molècules de classe II del complexa major d'histocompatibilitat o MHC, les quals s'expressen a la superfície de les cèl·lules presentadores d'antigen (APC) (per ex. cèl·lules dendrítiques, macròfags i limfòcits B), aquests gens serien els responsables de fins el 50% del risc genètic de desenvolupar DM1 (Achenbach et al., 2005). S'han identificat també altres gens que s'associen a un major risc de desenvolupar DM1, tot i que la seva contribució al risc relatiu de la malaltia és menor, són el locus del gen de la insulina, responsable del 10% de la susceptibilitat genètica pel desenvolupament de la DM1, el gen del CTLA-4 (proteïna 4 associada als limfòcits T citotòxics), el gen del receptor  $\alpha$  de la interleucina 2 (IL-2Ra) i el gen de la PTPN22 (proteïna tirosina fosfatasa no receptora tipus 22) (Todd et al., 2007). Recentment estudis d'associació genètica han suggerit nous loci candidats, codificants per gens involucrats en la senyalització immune, com el receptor tirosina quinasa ErbB3 (ERBB3), la proteïna adaptadora SH2B3 (SH2B3/LNK), el domini tipus dit de zinc TRAF 1 (TRAFD1) i la proteïna tirosina fosfatasa tipus 1 (PTPN11).

### 3.2.2. Mecanisme de l'atac autoimmune contra les cèl·lules beta

Durant el desenvolupament de la malaltia i prèviament a la destrucció de les cèl·lules beta té lloc la insulitis, procés que consisteix en la infiltració dels illots per una barreja de poblacions leucocitàries, principalment limfòcits T  $CD8^+$  i  $CD4^+$ , però també macròfags, cèl·lules dendrítiques i alguns limfòcits B. Posteriorment, la major part de les cèl·lules beta són destruïdes, essencialment per apoptosi, i aquest fet comporta que no es produeixi suficient insulina com per regular els nivells de glucosa, i en conseqüència apareixi la hiperglucèmia (Thomas and Kay, 2000).

Un cop iniciat el procés autoimmune contra els illots, el temps de progressió de la destrucció de les cèl·lules beta pot ser més o menys ràpid. En determinats individus el període d'insulitis

pot durar mesos, en d'altres poden passar anys abans que es desenvolupi una diabetis oberta (Kukreja and Maclaren, 1999).

L'atac autoimmune de les cèl·lules beta està orquestrat per una gran varietat de cèl·lules que produeixen citocines i altres mediadors citotòxics. Tant les cèl·lules B com les T tenen un paper efector en contra els antígens de les cèl·lules beta en pacients amb diabetis tipus 1. Les cèl·lules B, a més de les seves accions com a secretores d'anticossos, són cèl·lules presentadores d'antígens (APCs).

En la DM1 els limfòcits T  $CD8^+$  o citotòxics, tenen un rol principal en l'atac selectiu de les cèl·lules beta pel sistema immunitari. Es tracta doncs, d'una resposta immune de tipus Th1 o cel·lular (Mathis et al., 2001), no obstant això, també s'ha detectat un component humoral (propi d'una resposta Th2) ja que en molts pacients s'observen elevats nivells circulants d'autoanticossos contra antígens de les cèl·lules beta. Tanmateix, el mecanisme exacte de l'atac autoimmune així com la seva activació són qüestions encara desconegudes.

La DM1 presenta una fase pre-clínica que es pot detectar per la presència d'aquests autoanticossos dirigits contra les cèl·lules dels illots pancreàtics.

Els primers anticossos que es varen descriure van ser els dirigits contra antígens localitzats al citoplasma de totes les cèl·lules dels illots pancreàtics (ICA). Posteriorment es va poder disposar d'assaigs quantitius amb una alta sensibilitat i especificitat que van permetre detectar altres antígens i epitops insulars enfront els quals responen els limfòcits T  $CD4^+$  i  $CD8^+$  autoreactius i en contra els que es produeixen autoanticossos. Els principals antígens són: la insulina, la isoforma de 65 kDa de l'àcid glutàmic descarboxilasa (GAD65) i les molècules relacionades amb la proteïna tirosina fosfatasa IA-2 (IA-2A i IA-2B).

Diferents grups han dut a terme un seguiment prospectiu des del naixement de nadons amb un alt risc genètic de desenvolupar DM1, fet que ha permès estudiar la patogènia de la malaltia (Honeyman et al., 2000; Kupila et al., 2001; Rewers et al., 1996; Ziegler et al., 1993). Aquests estudis han demostrat que els anticossos apareixen varis anys abans del debut clínic de la DM1 i que, per tant, poden ser utilitzats per identificar a aquells individus amb un major risc per desenvolupar DM1. També s'ha comprovat que el risc d'aparició de DM1 i el període de temps des de l'aparició dels autoanticossos fins al desenvolupament de la DM1 es relaciona de manera directa amb el títol d'ICA i amb el número d'autoanticossos positius. Així doncs, els

pacients amb múltiples autoanticossos mostren un grau més elevat de progressió que els que només en tenen un. A més, s'ha determinat que el risc varia en funció del tipus d'autoanticòs contra els illots, essent els dirigits contra la IA-2 els que s'associen a un major risc de progressió a DM1 (Redondo and Eisenbarth, 2002). Més del 90% dels nous subjectes diagnosticats presenten autoanticossos contra un o més dels antígens descrits i els ràtios d'autoimmunitat assoleixen el 98% quan es combina la detecció d'aquests anticossos amb la detecció d'anticossos contra el més recentment descobert autoantigen del transportador de zinc 8 (ZnT8).

Pel que fa als limfòcits T autoreactius, en condicions normals es troben en sang perifèrica i en els òrgans limfoides sense tenir accés als teixits. Quan els antígens derivats de les cèl·lules beta (insulina, l'àcid glutàmic descarboxilasa, tirosina fosfatases) són recollits per les cèl·lules presentadores d'antigen (APCs) que es troben a l'illot, aquestes cèl·lules maduren i migren cap a nòduls limfàtics i pàncrees. En el nòdul limfàtic els limfòcits autoreactius entraran en contacte amb els antígens de les cèl·lules beta, s'activaran i migraran cap al teixit. Posteriorment els limfòcits T podran retrobar l'antigen present en les cèl·lules beta i es reactivaran iniciant el procés d'insulitis (Figura 7A).

S'ha proposat com a possible factor desencadenant de l'autoimmunitat l'onada apoptòtica neonatal que es dona en la fase de remodelació d'òrgans, que permetria a les APCs recollir i presentar els antígens de les cèl·lules beta. Aquest fet tindria conseqüències patològiques pels individus amb predisposició per desenvolupar la malaltia, els quals tenen una població leucocitària autoreactiva que podria activar-se davant d'antígens propis.

Els mecanismes que porten a la destrucció de les cèl·lules beta en la DM1 no estan totalment dilucidats, però sembla que poden donar-se per diferents vies en les que els limfòcits T CD8<sup>+</sup> o citotòxics hi tenen un paper principal i probablement involucren:

- 1) La secreció de citocines, incloent la IL-1 $\beta$ , el TNF $\alpha$  i l'INF $\gamma$  per part de les diferents cèl·lules immunes infiltrades en els illots (Fig 7B).
- 2) La secreció de quimiocines, induïda per les citocines, per les cèl·lules endotelials. Les quimiocines incrementen el reclutament de cèl·lules immunes dins els illots i, juntament amb les citocines, activen els limfòcits T CD8<sup>+</sup> (Fig. 7C).
- 3) La producció d'especies reactives d'oxigen, com el NO pels macròfags, les cèl·lules dendrítiques i les pròpies cèl·lules beta, les quals també secreten quimiocines en resposta a les

citocines, magnificant el reclutament i l'activació de les cèl·lules immunes (Fig. 7D). 4) La estimulació de l'apoptosi induïda pels limfòcits T CD8<sup>+</sup> activats via:

- a) L'expressió del lligand de Fas a la seva superfície (Fig. 7E)
- b) L'alliberament de perforina i granzima (Fig. 7F)
- c) La unió de les citocines als seus receptors de superfície en les cèl·lules beta: IL-1β activa NF-κB i les quinases PKC, p38 i JNK (Fig. 7 G). TNFα activa la caspasa 8, NF-κB, la MAPK p38 i JNK (Fig. 7 H). INFγ activa STAT-1 i la quinasa ERK (Fig. 7 I).

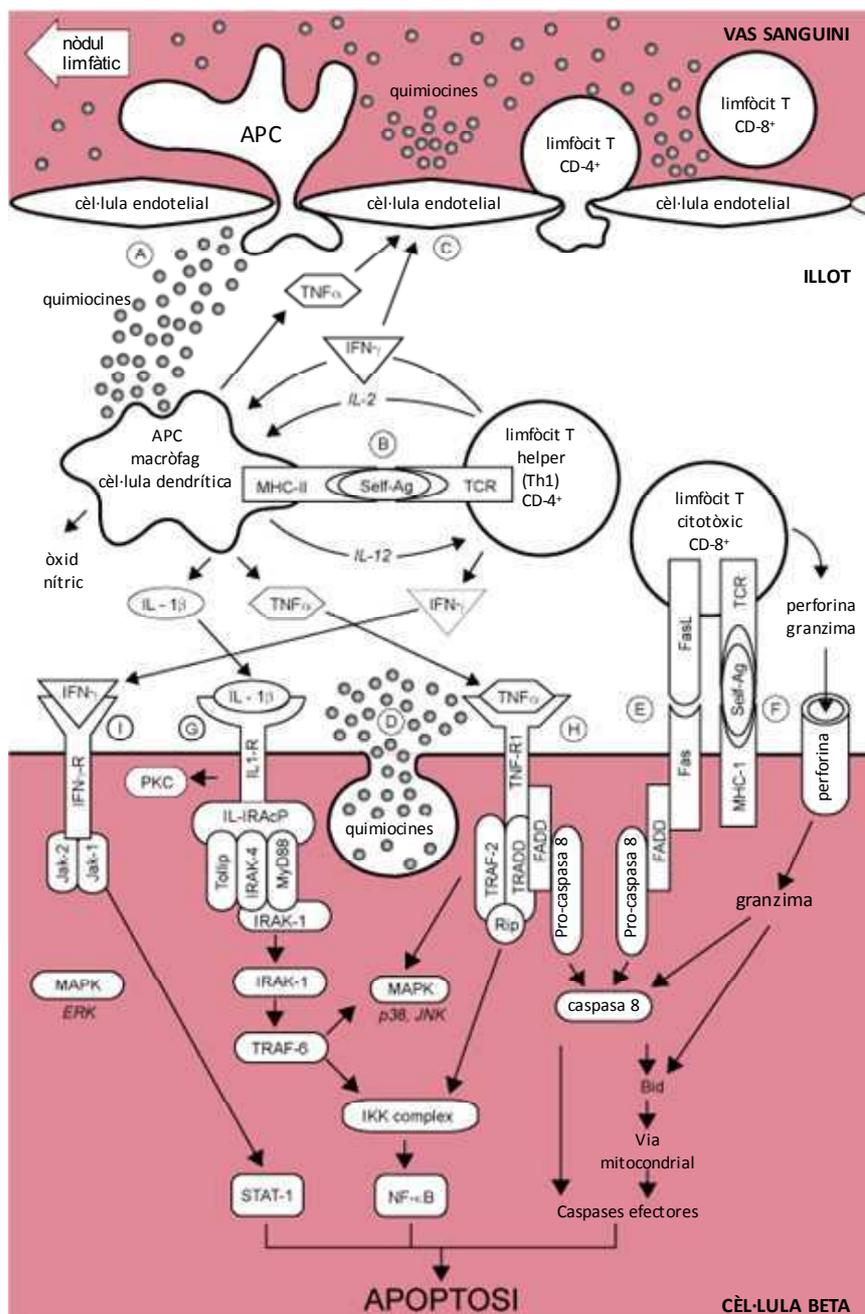


Figura 7. Representació esquemàtica de l'atac autoimmunitari de les cèl·lules beta en la diabetis tipus 1. Modificada de (Pirot et al., 2008).

Cal remarcar també, que les citocines secretades, addicionalment a la seva acció citotòxica directa sobre els illots, exerceixen un rol important incrementant l'expressió de les molècules MHC de classe I, les quals poden incrementar el reconeixement immune de les cèl·lules.

Pel que fa a la via de la perforina, s'estimula quan les cèl·lules T s'activen, mitjançant el reconeixement dels complexos MHC-pèptid específic en la superfície de les cèl·lules diana, produint-se una ràpida polarització dins els limfòcits T citotòxics i induint la mobilització dels lisosomes secretors, que contenen grànuls lítics, al llarg dels microtúbuls fins a la membrana plasmàtica on el contingut dels grànuls, les proteïnes citotòxiques, s'allibera en l'espai intercel·lular format entre el limfòcit T i la cèl·lula diana. La perforina o proteïna formadora del porus, homòloga amb el component C9 del complement, s'insereix en la membrana de la cèl·lula diana i polimeritza, creant-se un porus i facilitant així l'entrada de granzimes, proteïnes serina esterases, al citosol de les cèl·lules diana, induint la mort cel·lular mitjançant l'escissió de substrats cel·lulars citosòlics. La inducció de l'apoptosi es dona tant a través de la via de les caspases, com a través de vies independents de les caspases.

S'han identificat 11 granzimes en ratolins i cinc en els humans, les quals presenten dianes diferents, el que determina que la mort mitjançant granzima resulti particularment eficaç.

Addicionalment als danys causats per la perforina i les granzimas, els limfòcits CD8<sup>+</sup> també expressen el lligand de Fas que es troba als grànuls lítics i que, per tant, també s'allibera juntament amb les altres proteïnes citotòxiques. Els illots expressen Fas en un ambient inflamatori, sent aquesta una forma més per induir l'apoptosi per mitjà de les interaccions Fas - Fas lligand.

Així doncs, no existeix una única hipòtesi que expliqui com es produeix l'atac autoimmunitari que acabarà donant la destrucció cel·lular beta i l'aparició de la DM1. Diversos estudis en animals transgènics i knockout han indicat que el més probable és que es doni una combinació d'ambdós mecanismes, que de manera resumida serien:

- 1) la mort de la cèl·lula beta es donaria de manera directa mitjançant 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). En aquest mecanisme es requereix el contacte cèl·lula T/cèl·lula beta que podria produir-se per la via de la perforina

i/o la interacció Fas-Fas lligand (Fas és el principal receptor de membrana que transmet senyals de mort cap a l'interior de la cèl·lula).

2) la mort de la cèl·lula beta es produeix de manera indirecta, en aquest cas, la destrucció de les cèl·lules beta es donaria per mediadors citotòxics expressats pels limfòcits T pròxims a les cèl·lules diana. 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 reactius. Com a resultat de la interacció limfòcit T /APCs, els limfòcits T activats destruirien directament les cèl·lules beta veïnes, bé a través de la via de la perforina i/o Fas-FasL, o bé per la producció de mediadors solubles (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , 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.

En suma, la destrucció de les cèl·lules beta en la DM1 sembla dependre de la interacció entre macròfags i limfòcits CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> que provoquen una lesió inflamatòria crònica en la qual les citocines hi tenen un paper important.

### **3.3. Diabetis mellitus tipus 2**

La diabetis mellitus tipus 2 (DM2) es caracteritza per un defecte en la secreció d'insulina, massa beta insuficient i resistència perifèrica a la insulina.

En la patogènesi de la DM2 hi intervenen tant factors genètics com ambientals. Malgrat aquest caràcter multifactorial, la rapidesa amb que la DM2 ha augmentat en les últimes dècades respon sobretot a les modificacions en l'estil de vida de les societats actuals. Els factors ambientals que han afavorit l'epidèmia d'obesitat, com el consum d'aliments altament calòrics i la disminució de l'activitat física, han estat també determinants per l'expansió de la DM2 donat que l'obesitat és el principal factor de risc per desenvolupar la malaltia, sobretot a causa de la seva associació amb la resistència a la insulina. La condició d'obès multiplica el risc de patir diabetis per 10 en les dones, i per 11.2 en els homes (Field et al., 2001). La resistència a la insulina és un defecte estretament lligat a l'obesitat i, de fet, és la manera més important en què aquesta última contribueix a l'aparició de la diabetis.

### 3.3.1. Patogènesi de la diabetis mellitus de tipus 2

La DM2 és el resultat de la combinació de diverses anomalies en un mateix pacient:

- La resistència a la insulina, que determina una major demanda d'insulina per tal de poder mantenir els efectes d'aquesta en els seus teixits diana.
- Una disfunció en la cèl·lula beta, que no permet respondre correctament a la major necessitat d'insulina. Aquesta disfunció de les cèl·lules beta és la conseqüència del seu esgotament degut a l'augment de la demanda secretora que es produeix per contrarestar la resistència a la insulina, la dessensibilització de la cèl·lula beta provocada per les altes concentracions de glucosa i la lipotoxicitat. Algunes de les anomalies descrites en la secreció d'insulina són: l'absència de pulsació en la secreció, l'absència de la primera fase de la secreció i la disminució de la segona fase de secreció en resposta a la glucosa o l'augment de la secreció per proinsulina.
- Una reducció de la massa de cèl·lules beta productores d'insulina, molt probablement per un augment de l'apoptosi.

La conseqüència d'aquest conjunt d'anomalies és la impossibilitat del manteniment de la normoglicèmia.

La importància de la resistència a la insulina en la patogènesi de la DM2 és un fet àmpliament acceptat. Es tracta d'una anomalia que es pot detectar en la immensa majoria de diabètics de tipus 2, i nombrosos estudis prospectius han demostrat que és present des dels estadis més inicials de la malaltia.

El terme "resistència a la insulina" es defineix com la baixa resposta dels teixits diana de la insulina als seus efectes metabòlics. Les conseqüències que se'n deriven són diferents segons el teixit afectat. La insulina estimula la captació i la utilització de la glucosa en tot l'organisme, però preferentment en el múscul esquelètic. Conseqüentment, la resistència a la insulina en el múscul redueix significativament la utilització de la glucosa circulant. La producció hepàtica de glucosa està fortament inhibida per la insulina. La falta de sensibilitat a insulina en el fetge indueix un augment de la producció de glucosa que, al seu torn, contribueix a agreujar la hiperglicèmia característica de l'estat diabètic. El principal efecte de la insulina en el teixit adipós és la inhibició de la lipòlisi. Per tant, la menor sensibilitat a la insulina en aquest teixit

incrementa l'alliberament d'àcids grassos lliures a la circulació, els efectes dels quals són empitjorar encara més la resistència a la insulina en els altres teixits, donat l'ambient lipotòxic que s'hi origina (Gerich, 2003).

Ara bé, malgrat el seu important paper, la resistència a la insulina no és suficient per desencadenar la hiperglucèmia. La millor prova d'aquest fet és que una gran part dels individus obesos no arriben a desenvolupar DM2 (Mokdad et al., 2001), i que tampoc no presenten hiperglucèmia diversos models animals amb una severa obesitat o resistència a la insulina (Nandi et al., 2004). S'ha comprovat que en aquests casos, per evitar la diabetis, és decisiva la capacitat de la cèl·lula beta per adaptar la secreció d'insulina al grau de sensibilitat a aquesta. Aquest procés d'adaptació es coneix com a "resposta compensatòria de la cèl·lula beta" i és el resultat de la suma de dos processos: d'una banda, l'increment de la secreció d'insulina en cada cèl·lula beta i, de l'altra, l'augment de la massa cel·lular beta. El paper clau d'aquesta resposta, ha generat un gran interès per definir els mecanismes que la fan possible. Pel que fa a l'increment de la secreció d'insulina, s'ha proposat que pot tenir lloc gràcies a l'estimulació de certs factors circulants o per el sistema nerviós parasimpàtic, i a través d'un augment del metabolisme de la glucosa o una major expressió d'insulina (Prentki and Nolan, 2006). En el cas de la compensació mitjançada per l'augment de la massa beta, no s'ha constatat la implicació de cap factor concret.

Diversos estudis longitudinals de pacients diabètics tipus 2 han mostrat que durant l'estat prediabètic té lloc aquest increment de la insulinèmia, fet que demostra l'intent de compensació per part de la cèl·lula beta. Tanmateix aquesta hiperinsulinèmia només aconsegueix mantenir la normoglucèmia durant un cert temps, ja que el deteriorament progressiu de la cèl·lula beta condueix a l'aparició de la intolerància a la glucosa en primer lloc, i de diabetis en últim terme (Lillioja et al., 1993). Així doncs, la manca d'una resposta compensatòria eficient per part de la cèl·lula beta estaria causada per anomalies que poden afectar la secreció d'insulina o bé impedir el creixement adequat de la massa de cèl·lules beta.

Efectivament, ha estat descrit que en el desenvolupament de la DM2 hi participa una reducció de la massa de cèl·lules beta que no permet fer front a l'augment en la demanda metabòlica generada per la resistència a la insulina (Prentki and Nolan, 2006). Aquesta reducció en la massa beta s'ha demostrat en els models de diabetis 2 i més recentment s'ha confirmat de manera clara en humans, en els que es detecta abans de l'aparició de la hiperglucèmia (Butler

et al., 2003; Rahier et al., 2008). A més, també s'ha determinat que la freqüència de cèl·lules beta apoptòtiques esta augmentada en els pàncrees de malalts diabètics tipus 2. Aquestes dades suggereixen que el mecanisme a través del qual es redueix la massa beta en la diabetis tipus 2 és l'augment de la mort cel·lular per apoptosi.

Cal remarcar que en els darrers anys s'han assolit progressos substancials en la identificació de loci de risc pel desenvolupament de la diabetis tipus 2 mitjançant estudis d'associació del genoma complet (GWAS, de l'anglès Genome-Wide Association Study). I és també interessant, pel tema de la present tesi, fer esment a l'associació descrita entre la proteïna d'unió al factor de creixement similar a la insulina 2 (IGFBP2), que s'uneix als elements leader de les regions no traduïdes dels transcrits del factor de creixement similar a la insulina 2 (IGF2) i regula la traducció d'IGF2 durant el desenvolupament tardà en mamífers (Nielsen et al., 1999), i la diabetis tipus 2 (Saxena et al., 2007; Scott et al., 2007; Zeggini et al., 2007).

En definitiva, es creu que molts dels defectes descrits són hereditaris i actuen com a factor predisposant per al desenvolupament de la DM2. La coincidència entre la predisposició genètica i la resistència a la insulina adquirida a causa de l'obesitat, provocaria que la cèl·lula beta acabés fallant en veure's forçada a secretar insulina per sobre de la seva capacitat. A mesura que la malaltia avança, també contribueixen al deteriorament altres anomalies adquirides, provocades tant per la pròpia hiperglucèmia (glucotoxicitat) com per l'ambient lipotòxic derivat de l'obesitat (Leahy, 2005).

#### 4. CITOCINES PROINFLAMATÒRIES

Les citocines són mediadors peptídics de la comunicació de l'estrès intercel·lular que fan el seu efecte mitjançant accions autocrines, paracrines i endocrines.

Pràcticament totes les cèl·lules nucleades produeixen i responen a citocines quan es troben en determinades condicions, principalment en resposta a senyals d'estrès i paral·lelament a les seves funcions diferenciades.

El grup de les citocines engloba diversos centenars de proteïnes individuals, incloent 37 interleucines (ILs) i una multitud de quimiocines. Moltes d'aquestes molècules tenen funcions redundants, d'altres en canvi provoquen reaccions cel·lulars específiques, i es discuteix si les citocines també tenen propietats homeostàtiques, és a dir, si contribueixen al manteniment de la fisiologia cel·lular normal. Les citocines són mediadors centrals de la inflamació mitjançant el seu rol en el control de la resposta immune innata i adaptativa, així com en el dany tissular, la defensa, la reparació i la remodelació.

Tradicionalment les citocines s'han dividit en proinflamatòries (ex. IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) i antiinflamatòries (ex. IL-1Ra, IL-4, IL-10, IL-13). Les citocines efectores de funcions proinflamatòries poden ser inhibides per citocines antiinflamatòries o antagonistes específics dels receptors de citocines. En un elevat número de patologies s'ha observat una variació en el balanç entre les citocines pro- i antiinflamatòries (Opal and DePalo, 2000).

##### 4.1. Família de la interleucina 1 (IL-1)

La família de la IL-1 està formada, d'una banda, per mediadors proinflamatoris entre els que trobem els lligands: la interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) i la interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), el receptor tipus 1 (IL-1R1), proteïnes lligades als receptors com la proteïna accessòria (IL-1RacP), la proteïna quinasa associada al receptor (IRAK) i l'enzim convertidor d'IL-1 (ICE)/caspasa 1 (CASP1), i de l'altra banda, per mediadors antiinflamatoris que inclouen: l'antagonista del receptor d'interleucina 1 (IL-1Ra) i el receptor de tipus 2 (IL-1R2) (Fig. 8).

Les dues isoformes de la IL-1 ( $\alpha$  i  $\beta$ ) estan codificades per diferents gens però estan estructuralment relacionades i, a l'igual que el IL-1Ra, són glicoproteïnes que es secreten i

s'uneixen als receptors de la IL-1. Els dos receptors (IL-1R1 i IL-1R2) són el producte de dos gens diferents i en humans les seves principals fonts cel·lulars són els fagocits mononuclears, els fibroblasts, els queratinòcits i els limfòcits T i B.

#### 4.1.1. La interleucina 1 (IL-1)

Tant la IL-1 $\alpha$  com la IL-1 $\beta$  es sintetitzen com a precursors glicosilats. La citocina proinflamatòria IL-1 $\beta$  es sintetitza com a proteïna immadura de 31 kDa anomenada pro-IL-1 $\beta$ . La pro-IL-1 $\beta$  es manté en el citosol fins que és tallada proteolíticament per l'enzim convertidor d'IL-1 (ICE)/caspasa 1 (CASP1) i esdevé la forma madura de la IL-1 $\beta$  de 17.5 kDa. (Fig. 8). Una petita quantitat de la pro-IL-1 $\beta$  pot ser exportada fora de la cèl·lula quan es bloqueja l'activitat ICE. S'ha determinat que la sobreexpressió d'ICE potencia la mort cel·lular mitjançada per Fas, i en canvi la inhibició de l'activitat ICE evita aquest tipus d'apoptosi.

La secreció de la IL-1 es dona des de diversos tipus cel·lulars i és induïda per diferents estímuls inflamatoris, com productes bacterians (per exemple LPS), altres citocines (per exemple TNF $\alpha$ ) i lípids bioactius (per exemple el factor activador de plaquetes).

Els efectes sistèmics de la IL-1 es reflecteixen en la regulació de la taxa de metabolisme basal, els nivells de glucosa en sang, la pressió sanguínia, el metabolisme del ferro i la remodelació de l'os (Dinarello, 1996). A més la IL-1 s'ha descrit com a una molècula crítica per l'enllaç entre el sistema immune i neuroendocrí, participant en processos com la regulació tèrmica i la percepció del dolor i de la gana. La IL-1 promou l'adhesió de neutròfils i altres cèl·lules mitjançant l'estimulació de l'expressió de molècules d'adhesió com les molècules d'adhesió intercel·lular (ICAM-1/CD54), la molècula-1 d'adhesió cel·lular vascular (VCAM-1/CD106), i la L-selectina (Tsang et al., 1997). A més, la IL-1 té diversos efectes deleteris sobre les cèl·lules pancreàtiques, com descriurem en els següents apartats.

#### **4.2. Senyalització intracel·lular d'interleucina 1 (IL-1)**

La IL-1 s'uneix al receptor IL-1R, encarregat de transduir el senyal cap a l'interior de la cèl·lula, a través de la interacció amb dos dominis, aquesta unió provoca un canvi conformacional i el

reclutament de la proteïna accessòria formant el complex actiu que serà internalitzat i desencadenarà la transducció del senyal i la inducció de l'acció biològica.

La interacció de la IL-1 amb el seu receptor indueix senyals bioquímics i de senyalització com la fosforilació de múltiples proteïnes i l'activació de fosfatases (Brooks and Mizel, 1994; Kuno and Matsushima, 1994; O'Neill, 1995). Ara bé, no ha estat identificat l'ordre dels events que es donen en la cascada de senyalització, tot i que se sap que són específics depenent del tipus cel·lular. En general està acceptat que les principals vies de transducció de senyal activades per la IL-1 són la via del factor de transcripció NFκB, la via de PKC i la de MAPK/p38/JNK (Fig 8).

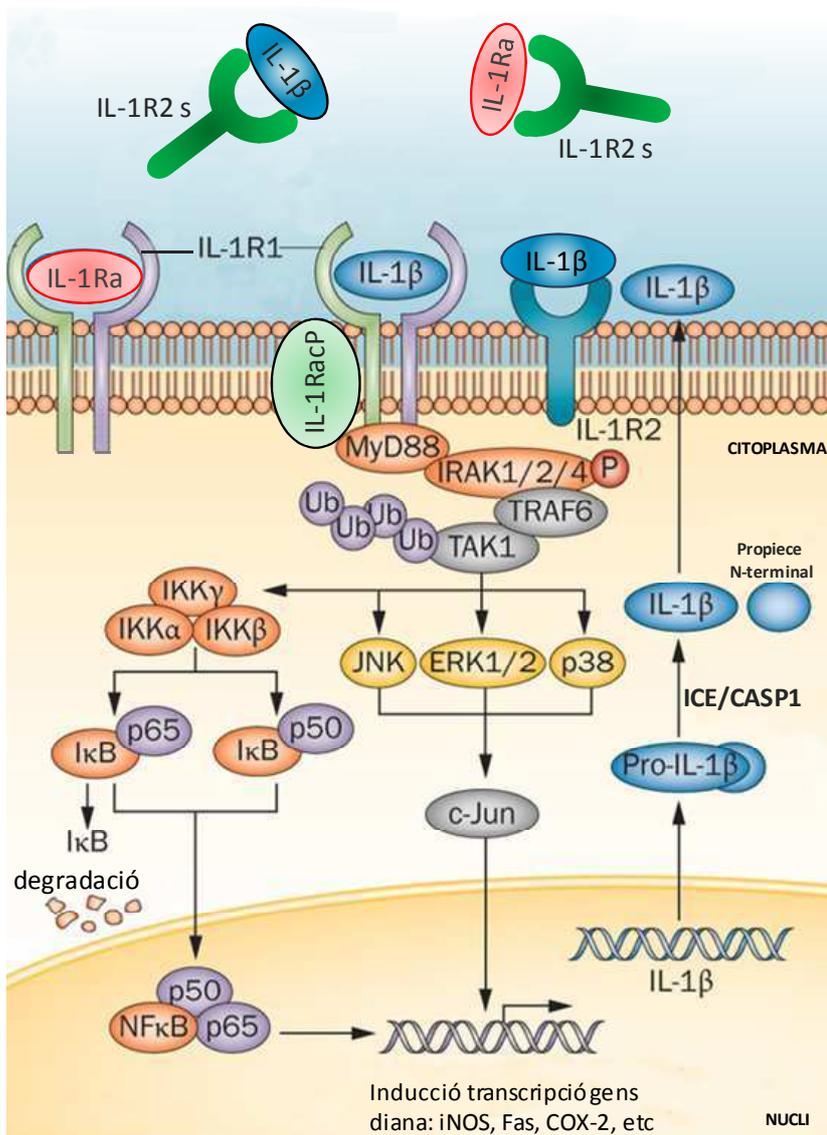


Figura 8. Esquema de la via de transducció de senyal i la síntesi de la IL-1β. Modificat de (Risbud and Shapiro, 2014).

S'ha descrit que la IL-1 $\beta$  activa la via de la quinasa N-terminal c-Jun (JNK) en les cèl·lules beta (Major and Wolf, 2001). Les JNK són quinases activades per mitogens (MAPK) que responen a estímuls d'estrès i estan implicades en la transmissió de l'estrès i en la senyalització apoptòtica en diversos tipus cel·lulars. L'activació de les JNK s'aconsegueix mitjançant la fosforilació dual de la Thr183 i la Tyr185 per les MAP quinasa quinases específiques, MKK4 MKK7, que al seu torn són activades per una MAPK (Chang and Karin, 2001). Les JNK tenen un paper fonamental en l'apoptosi de les cèl·lules beta mitjançada per citocines com suggereix la prevenció de l'apoptosi resultant de la inhibició de la via de les JNK (Ammendrup et al., 2000; Bonny et al., 2001). A més, l'activació de les JNK està implicada en la reducció de l'expressió del gen de la insulina deguda a l'estrès oxidatiu en les cèl·lules beta, s'ha determinat que la supressió de les vies de les JNK protegeix les cèl·lules beta de l'estrès oxidatiu (Kaneto et al., 2002). Per tant, fortes evidències apunten a les JNK com a reguladors clau de la funció i l'apoptosi de les cèl·lules beta. No obstant això, els esdeveniments que regulen l'activació de les JNK per part de la IL-1 $\beta$  en les cèl·lules productores d'insulina segueixen sent en gran part desconeguts. La comprensió d'aquests mecanismes pot portar a la identificació de dianes per a la intervenció farmacològica pel tractament de la diabetis i la fallada de l'empelt d'illots.

Cal esmentar també, que els efectes de la IL-1 estan estretament controlats per diversos inhibidors d'origen natural, com són el IL-1Ra, el IL-1R2 i altres receptors solubles (Fig 8). L'ús d'antagonistes de la IL-1 ha estat associat amb efectes beneficiosos en pacients amb condicions autoinflamatòries hereditàries relacionades amb l'excés de senyalització d'IL-1, com criopirinopaties i la deficiència d'IL-1Ra (revisat per (Banerjee and Saxena, 2012)). L'activitat antagonista d'IL-1Ra es basa en la seva capacitat per unir-se al IL-1R1 amb gairebé la mateixa afinitat que la IL-1 $\alpha$  i la IL-1 $\beta$  i bloquejar d'aquesta manera la formació de l'heterodímer IL-1R1/IL-1RAcP interrompent la transducció del senyal (Fig. 8). A diferència de la IL-1 $\beta$ , el IL-1Ra té només un lloc d'unió, per tant, actua amb els receptors mitjançant la interacció amb un sol domini i aquesta unió no és suficient perquè es doni el canvi conformacional del IL-1R1 impedit l'acoblament de la proteïna accessòria i evitant d'aquesta manera la formació del complex actiu i la transducció del senyal. Tot i que la afinitat d'unió del IL-1Ra al IL-1R1 és alta, es necessita una concentració molar d'entre 10-100 vegades superior per inhibir l'activitat de la IL-1 (Dinarello, 1996). A més, la unió d'IL-1Ra al receptor tipus 1 presenta afinitat diferent depenent si el receptor es troba en forma soluble (Kd = 70 pM) o ancorat a la membrana citoplasmàtica (Kd = 200 pM).

### 4.3. IL-1 $\beta$ i cèl·lula beta

La interleucina 1 té diversos efectes deleteris sobre les cèl·lules pancreàtiques. *In vitro*, l'exposició dels illots pancreàtics a la IL-1 $\beta$  sola o en combinació amb l'interferó gamma (IFN)- $\gamma$  i/o el factor de necrosi tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) induïx la mort cel·lular beta en illots de ratolí, de rata i humans (Eizirik and Mandrup-Poulsen, 2001; Mathis et al., 2001; Saldeen, 2000), condueix a un deteriorament de funció de les cèl·lules beta (Eizirik and Mandrup-Poulsen, 2001) i inhibeix la seva replicació (Eizirik et al., 1990; Maedler et al., 2001; Sjöholm, 1991; Southern et al., 1990a; Téllez et al., 2005). *In vivo*, la IL-1 és un mediador clau de la inflamació, la febre i la resposta de fase aguda i té importants funcions en la defensa immune innata contra els microbis, el trauma i l'estrès, a més, es tracta també d'una molècula efectora implicada en la destrucció tissular i la fibrosi. La IL-1 té un paper clau en la destrucció de les cèl·lules beta pancreàtiques que es dona en la diabetis mellitus tipus 1 i tipus 2 i l'increment de la mort beta els primers dies després del trasplantament d'illots pancreàtics. L'evidència del paper de la IL-1 $\beta$  en la mort de les cèl·lules beta *in vivo* es va observar en ratolins NOD deficientes per IL-1R, els quals presentaven un retard en l'aparició de la diabetis (Thomas et al., 2004). A més, el bloqueig de la senyalització de la IL-1 amb l'antagonista del receptor de la IL-1, endarrerix l'aparició de la diabetis en ratolins NOD, evita la inducció de la diabetis mitjançant múltiples dosis de STZ, prolonga la supervivència dels al·loempelts d'illots, impedeix la recurrència de la hiperglucèmia en ratolins NOD diabètics després del trasplantament d'illots i millora el pronòstic del trasplantament en un model singènic (Téllez et al., 2007).

#### 4.3.1. IL-1 $\beta$ i funció de la cèl·lula beta

La primera evidència de que les citocines alteren la funció beta es va tenir al cultivar illots amb el sobrenedant de cultius de macròfags i es va observar la inhibició de la secreció de la insulina (Mandrup-Poulsen et al., 1985). Posteriorment es va determinar que el principal factor inhibidor era la IL-1 (Mandrup-Poulsen et al., 1986).

El grau d'inhibició de la secreció d'insulina depèn de les concentracions d'IL-1 $\beta$  i del temps d'exposició a la citocina, indicant 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 funció beta són reversibles, així illots de rata cultivats 15 h amb IL-1 $\beta$  restableixen la secreció normal després de 4 dies de cultiu en medi lliure de la citocina (Palmer et al., 1989). A més aquesta inhibició és específica de les cèl·lules beta, ja que la secreció de glucagó no es troba afectada per la citocina (Ling et al., 1998). Aquesta toxicitat selectiva podria ser deguda a que la IL-1 $\beta$  indueix l'expressió d'iNOS exclusivament en cèl·lules beta (Eizirik et al., 1993). L'òxid nítric produït inhibeix l'aconitasa (Scarim et al., 1997), enzim del cicle de Krebs, aquesta inhibició pot provocar un defecte en el metabolisme de la glucosa conduint a una disminució de la producció d'ATP i la inhibició de la secreció d'insulina. Per altra banda, també s'ha descrit que el bloqueig d'iNOS evita la inhibició de la secreció d'insulina en cèl·lules exposades a IL-1 $\beta$ . Per tant, la inhibició de la secreció d'insulina induïda per la IL-1 $\beta$  es deu en gran part a l'augment de la producció d'òxid nítric (NO).

Cal remarcar l'existència de diferències importants en els efectes de la IL-1 $\beta$  sobre els illots pancreàtics de diferents espècies. Entre els illots de ratolí, rata i humana, els illots de rata són els més sensibles als efectes deleters de la citocina, en canvi existeixen discrepàncies pel que fa als efectes de la IL-1 $\beta$  sobre els illots humans.

### 4.3.2. IL-1 $\beta$ i viabilitat de la cèl·lula beta

Diversos estudis han posat de manifest que l'exposició dels illots pancreàtics a la IL-1 $\beta$ , sola o en combinació amb l'interferó gamma (IFN)- $\gamma$  i/o el factor de necrosi tumoral alfa TNF $\alpha$ , induïx la mort cel·lular beta en illots de ratolí, de rata i humans (Eizirik and Mandrup-Poulsen, 2001; Mathis et al., 2001; Saldeen, 2000).

La mort induïda per la IL-1 $\beta$  es dona tant per processos necròtics com per apoptòtics. D'una banda, ha estat descrit que la IL-1 $\beta$  provoca una fragmentació del DNA, característica típica del procés apoptòtic, així com un augment en els nivells de ceràmides i de molècules implicades en la senyalització de l'apoptosi (Rabinovitch et al., 1994; Welsh, 1996), de l'altra, s'ha determinat un augment dels nivells d'òxid nítric en cèl·lules beta exposades a IL-1 $\beta$ , fet que es relacionaria amb un augment de la necrosi (Zumsteg et al., 2000).

Al igual que pels efectes de la IL-1 $\beta$  sobre la funció de les cèl·lules beta, els efectes de la citocina sobre la viabilitat beta són variables entre espècies. Per induir un augment de la mort

cel·lular a illots de ratolí cal exposar-los a la combinació IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  i TNF $\alpha$ , que provocarà la mort cel·lular tant per necrosi com per apoptosi (Hoorens et al., 2001; Pavlovic et al., 1999). Els illots humans també responen a aquesta barreja de citocines però en aquest cas la mort que s'indueix és bàsicament per apoptosi (Delaney et al., 1997). Finalment, la IL-1 $\beta$  sola provoca la mort per apoptosi de les cèl·lules beta dels illots de rata.

També s'ha determinat que l'efecte de les citocines és diferent en cèl·lules beta aïllades o en illots sencers. En cèl·lules beta de rosegador aïllades el tipus de mort que predomina és l'apoptosi (Hoorens et al., 2001), en canvi, quan és l'illot sencer el que s'exposa a les citocines, principalment augmenta la necrosi, mentre que l'apoptosi ho fa en menor grau (Saldeen, 2000), aquest fet fa pensar que en els illots sencers de ratolí es produeixen concentracions locals d'òxid nítric més elevades que en les cèl·lules aïllades (Hoorens et al., 2001). L'augment de les concentracions de NO serien les responsables de l'activació de l'òxid nítric sintasa (iNOS) la qual tindria un paper important en la necrosi induïda per citocines en les cèl·lules beta de rosegadors. Pel contrari, en el cas dels illots humans, en que l'exposició a la combinació de citocines indueix la mort bàsicament per apoptosi, el NO no hi jugaria cap paper, tal i com es va demostrar amb l'ús d'inhibidors de l'iNOS, que no van tenir cap efecte sobre l'apoptosi dels illots humans exposats a citocines (Delaney et al., 1997).

#### 4.3.3. IL-1 $\beta$ i proliferació de la cèl·lula beta

La IL-1 $\beta$  també exerceix efectes inhibitoris sobre la replicació de les cèl·lules beta pancreàtiques (Eizirik et al., 1990; Maedler et al., 2001; Sjöholm, 1991; Southern et al., 1990b; Téllez et al., 2005), ara bé, aquests efectes de la citocina sobre la proliferació beta han estat menys estudiats.

En un model de trasplantament d'illots pancreàtics, el nostre grup ha descrit que la sobreexpressió de l'antagonista del receptor d'IL-1 en els illots trasplantats, augmenta la replicació i la massa beta (Téllez et al., 2007), suggerint que la IL-1 $\beta$  té un rol important en la inhibició de la replicació beta i la reducció de la massa beta.

Per tant, la IL-1 $\beta$  pot tenir un doble paper en la pèrdua de la massa beta, per una banda induint la mort cel·lular beta i per l'altra inhibint la replicació de les cèl·lules beta.

#### **4.4. IL-1 $\beta$ i la diabetis mellitus**

Les citocines proinflamatòries i en particular la IL-1 $\beta$  tenen efectes clarament deleteris sobre les cèl·lules beta pancreàtiques i contribueixen de forma important al dany cel·lular beta en la diabetis tipus 1 (Eizirik and Mandrup-Poulsen, 2001; Mandrup-Poulsen, 1996) i també en el desenvolupament de la diabetis tipus 2 (Fève and Bastard, 2009; Guest et al., 2008; Larsen et al., 2007; Maedler et al., 2002b; Sathyapalan and Atkin, 2011).

##### 4.4.1. IL- 1 $\beta$ i la diabetis mellitus tipus 1

El paper de la IL-1 $\beta$ , conjuntament amb el de altres diverses citocines proinflamatòries està àmpliament acceptat en el desenvolupament de la diabetis tipus 1, tant a nivell del sistema immune com a nivell de les cèl·lules beta (Eizirik and Mandrup-Poulsen, 2001; Rabinovitch and Suarez-Pinzon, 2003).

Com s'ha comentat, la senyalització de la IL-1 participa en la disfunció de les cèl·lules beta i la seva destrucció a través de NF-kB i les vies de les quinases activades per mitogens, que condueixen a l'estrés mitocondrial i del reticle endoplasmàtic i, finalment, a la activació de la maquinaria apoptòtica.

A més, la IL-1 $\beta$  actua sobre la regulació dels limfòcits T. L'efecte modulador de la IL-1 $\beta$  en la interacció entre els sistemes immunes innat i adaptatiu i els seus efectes sobre les cèl·lules beta fan d'aquesta molècula un potencial objectiu d'intervenció en la diabetis mellitus autoimmune. L'eliminació genètica o farmacològica de la acció de la IL-1 redueix la incidència de la malaltia en models animals de diabetis mellitus tipus 1, els quals apunten a un paper modulador de la citocina a nivell de la funció del sistema immune, en la sensibilitat a la insulina o en la funció beta pancreàtica (Eizirik and Mandrup-Poulsen, 2001; Mandrup-Poulsen, 1996), així com en assaigs clínics en que s'han començat a estudiar la factibilitat, seguretat i eficàcia del bloqueig de la IL-1 com a tractament en pacients amb DM1.

Per altra banda, la inhibició de la acció de la IL-1 té una eficàcia clínica en moltes malalties inflamatòries, com són els trastorns hereditaris autoinflamatoris, la febre hereditària familiar, la gota, l'artritis reumatoide i la diabetis mellitus tipus 2 (DM2). La DM2 és una malaltia

metabòlica causada per la resistència a la insulina i la fallada beta i ambdues alteracions presenten components inflamatoris.

#### 4.4.2. IL-1 $\beta$ i la diabetis mellitus tipus 2

Estudis recents realitzats en models animals, cultius cel·lulars i assaig clínics, proporcionen evidències que donen suport a un paper causal de la IL-1 $\beta$  com a agonista primari en la pèrdua de la massa beta que es dona en la diabetis tipus 2. *In vitro*, el procés autoinflamatori mitjançat per la IL-1 $\beta$  resulta en la mort cel·lular beta. L'autoinflamació ve donada per la glucosa, els àcids grassos lliures, la leptina i la pròpia IL-1 $\beta$ . Per l'activitat de la IL-1 $\beta$  es requereix la caspasa-1 i l'alliberament d'àcids grassos per part dels adipòcits.

La hipòtesi que el desequilibri entre la IL-1 $\beta$  i l'antagonista del receptor d'IL-1 (IL-1Ra) determina la inflamació de l'illot té cada vegada més suport. El bloqueig del receptor de IL-1 amb anakinra, la forma recombinant del IL-1Ra, o la seva neutralització amb anticossos, indica que la reducció de l'activitat de la IL-1 $\beta$  és suficient per corregir la producció disfuncional d'insulina en la diabetis tipus 2, incloent la possibilitat que la supressió de la inflamació mitjançada per la IL-1 $\beta$  en el microambient dels illots permeti la seva regeneració.

La diabetis tipus 2 es manifesta per la hiperglucèmia que resulta de la resistència a la insulina i la disminució de la seva secreció. La inflamació és un event clau estretament associat amb la seva fisiopatologia. Els nivells de diferents citocines pertanyents a la família de la IL-1, com el IL-1Ra i la IL-18, en pacients diabètics tipus 2 s'han sumat a la creixent evidència que la diabetis tipus 2 és un estat inflamatori crònic de grau baix. Les concentracions de diverses proteïnes de fase aguda, citocines i quimiocines, són elevades en els pacients amb diabetis tipus 2 en comparació amb els individus sense la malaltia i, en particular, els nivells de la citocina proinflamatòria IL-1 $\beta$ , la qual, tal i com ja s'ha mencionat, inhibeix la funció de les cèl·lules i en promou l'apoptosi. En definitiva doncs, podríem dir que la diabetis tipus 2 és un estat proinflamatori, amb augment dels nivells de citocines circulants, el que suggereix un paper causal de la inflamació en la seva etiologia.

L'aspecte estructural i funcional de la família de la IL-1 ha estat descrit per diversos grups, però la important variació genètica de les citocines en diferents poblacions fa necessari l'aprofundiment dels estudis d'associació dels polimorfismes genètics de la família dels gens de

la IL-1 i altres citocines pro- i antiinflamatòries per poder determinar els haplotips indicadors de susceptibilitat per a la diabetis tipus 2 en diverses poblacions.

No obstant això, els mecanismes reals de l'enorme nombre de citocines requerirà posteriors investigacions per tal d'explicar la relació entre la inflamació crònica i l'activació del sistema immune en la patogènesi de la diabetis tipus 2. Per tant, seran necessaris nous estudis sobre mediadors immunològics pro-i anti-inflamatoris per donar suport a la hipòtesi que la inflamació de grau baix contribueix al desenvolupament de la diabetis tipus 2, tant mitjançant la inducció de la resistència a la insulina com per la reducció de la secreció d'insulina (revisat per (Banerjee and Saxena, 2012)).

#### **4.5. IL-1 $\beta$ i la destrucció dels illots pancreàtics trasplantats**

Pel que fa al trasplantament d'illots pancreàtics, s'ha descrit que els primers dies després del trasplantament es dona un procés inflamatori inespecífic i independent del rebuig que podria afectar la viabilitat i la funció dels illots trasplantats (Biarnés et al., 2002). Aquesta inflamació inespecífica podria ser una de les causes de la gran pèrdua de massa beta que es dona aquests primers dies post-trasplantament. En el nostre grup hem descrit un augment de l'expressió del gen de la IL-1 $\beta$  i d'iNOS en els empelts d'illots singènics els primers dies després del trasplantament (Montolio et al., 2007a; Montolio et al., 2007b). També hem demostrat que la IL-1 juga un paper important en la pèrdua de la massa beta trasplantada, ja que amb la inhibició de la senyalització d'IL-1 s'aconsegueix augmentar la replicació i la massa de les cèl·lules beta i millorar el pronòstic del trasplantament d'illots (Téllez et al., 2007). Aquests resultats, conjuntament amb els obtinguts per Ozasa *et al.* (Ozasa et al., 1997) en que confirmen un augment de l'expressió d'IL-1 $\beta$  en empelts d'illots, tant al·logènics com singènics, post-trasplantament, i amb l'estudi de Gysemans *et al.* (Gysemans et al., 2003) en que determinen un increment d'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B i altres citocines en empelts d'illots xenogènics a les 8 hores del trasplantament, donen suport a la hipòtesi que la inflamació no específica que té lloc els primers dies després del trasplantament d'illots pancreàtics pot afectar negativament la funció i la viabilitat de les cèl·lules beta trasplantades i que la IL-1 $\beta$  pot tenir-hi un paper molt important.

## 5. TERÀPIES PER LA DIABETIS

Actualment el tractament per la diabetis tipus 1 consisteix en l'administració d'insulina exògena. Es tracta d'un tractament substitutiu que, malgrat ser molt efectiu, presenta importants limitacions, la principal de les quals és la incapacitat per mantenir un control glucèmic normal, fet que pot desencadenar l'aparició de les complicacions cròniques de la malaltia.

Cal esmentar però, que amb les pautes de tractament intensificat actuals alguns malalts aconseguixen bons controls glucèmics que permeten retardar l'aparició de complicacions clíniques a llarg termini.

Actualment s'han intensificat els estudis que tenen com objectiu el desenvolupament de tractaments curatius per la diabetis. Les teràpies en desenvolupament s'orienten, d'una banda, a aturar la lesió autoimmune que es dona en la diabetis tipus 1, i de l'altra, al restabliment de la massa beta, que es troba disminuïda tant en els malalts diabètics tipus 1 com tipus 2.

Les dues vies mitjançant les quals es podria assolir el restabliment de la massa beta en malalts amb diabetis són, per un costat la regeneració de la pròpia massa beta del pacient, i per l'altre la restauració de la massa cel·lular beta per implantació de cèl·lules productores d'insulina provinent d'una font externa.

### 5.1. Teràpia regenerativa

La regeneració de la massa cel·lular beta en la diabetis pot donar-se principalment mitjançant dos mecanismes, el primer és la proliferació de les cèl·lules beta residuals, i el segon la generació de noves cèl·lules beta a partir de precursors pancreàtics.

Pel que fa a la proliferació, un punt important a considerar en l'aplicació de la teràpia regenerativa per el tractament de la diabetis és avaluar si els pacients diabètics tipus 1 mantenen cèl·lules beta residuals. Malgrat clàssicament es creia que la pèrdua de la massa beta era total en els diabètics tipus 1, el grup de Butler va descriure en un anàlisi retrospectiu realitzat en una sèrie d'autòpsies, que un important subgrup de pacients amb diabetis tipus 1 mantienien cèl·lules beta residuals (Meier et al., 2005). Més recentment, l'estudi de pàncrees

de donants en que la diabetis havia tingut una aparició molt primerenca va demostrar també la presència de cèl·lules beta residuals (Gianani et al., 2010). L'existència de cèl·lules beta en aquests subjectes podria ser una evidència indirecta de regeneració, tal com van concloure Butler i col·laboradors basant-se principalment en la detecció d'apoptosi en les cèl·lules beta residuals, fet que suggereix l'existència de regeneració per contrarestar-la i poder explicar la presència de cèl·lules beta.

Un estudi recent ha posat de manifest l'existència d'una gran variabilitat en els patrons de pèrdua de cèl·lules beta al llarg del temps, tant entre pacients diabètics tipus 1 com entre diferents regions dins d'un mateix pàncrees, podent-se trobar àrees on la manca d'insulina és total i altres zones on se'n pot detectar clarament l'expressió (Coppieters et al., 2012).

Ara bé, altres dades semblen indicar que la regeneració beta podria no donar-se en la diabetis i en el cas que es presentes seria un fenomen poc comú i poc robust, considerant el fet que una part molt important de pacients amb un llarg historial de diabetis tipus 1 presenten una manca total de cèl·lules beta (Gianani, 2011).

Pel que fa a la generació de noves cèl·lules beta a partir de precursors no endocrins, la teràpia regenerativa es basa en la capacitat d'algunes cèl·lules per convertir-se en altres tipus cel·lulars amb un fenotip diferent. Aquest procés de conversió es el que coneixem com a diferenciació cel·lular, i la capacitat que té cada cèl·lula per modificar el seu fenotip en funció dels senyals que rep s'anomena plasticitat cel·lular. Les cèl·lules que posseeixen l'habilitat d'autorenovar-se i diferenciar-se en altres tipus cel·lulars són les denominades cèl·lules mare i constitueixen un interessant potencial terapèutic.

Existeixen quatre grups de cèl·lules mare: Les totipotents, que es formen a partir del zigot durant els 2-3 primers dies i tenen la capacitat de generar tots els diferents tipus cel·lulars de l'organisme, incloent els teixits embrionaris i extraembrionaris. Les pluripotents o cèl·lules mare embrionàries, que s'extreuen de l'embrió als 4-5 dies posteriors a la fecundació de l'òocit i poden donar lloc a qualsevol tipus cel·lular dels llinatges embrionaris (ecto, meso i endoderm) així com al sac vitel·lí i al llinatge germinal. Les multipotents, que tenen la capacitat de generar qualsevol tipus cel·lular del propi llinatge embrionari, per exemple les cèl·lules mare mesènquimals del moll de l'os, de naturalesa mesodèrmica, poden donar lloc a totes aquelles

cèl·lules que tinguin el mateix origen mesodèrmic. I per últim les unipotents, amb la capacitat d'autorenovar-se i diferenciar-se cap a un tipus cel·lular concret.

En l'embrió les cèl·lules beta pancreàtiques s'originen a partir de cèl·lules precursoras multipotents que són comuns pel compartiment exocrí i endocrí. Aquestes cèl·lules progenitores, d'origen endodèrmic, es troben en els extrems de l'arbre ductal proto-diferenciat que es forma per invaginació de l'epiteli al voltant del dia E9.5 del desenvolupament embrionari de ratolí, i es caracteritzen per expressar Pdx-1, Ptf1a (de l'anglès Pancreas Transcription Factor subunit-1), cMyc i CPA (Carboxipeptidasa A) (Zhou et al., 2007).

Malgrat que a dia E9.5 es poden trobar algunes cèl·lules endocrines, majoritàriament cèl·lules alfa, no és fins als dies E10.5 - E13.5 del desenvolupament embrionari quan s'inicia la gran onada de diferenciació del compartiment endocrí del pàncrees, període anomenat "transició secundària" que s'allarga fins el dia E16.5 (revisat a (Jørgensen et al., 2007; Oliver-Krasinski and Stoffers, 2008)).

Els últims anys s'han identificat diversos marcadors dels progenitors de les cèl·lules endocrines mitjançant tècniques de marcatge genètic, que han permès fer el seguiment del llinatge d'un tipus cel·lular concret, fet que ha significat un gran avenç en la biologia del desenvolupament i la medicina regenerativa.

L'anàlisi i els diferents estudis de la regeneració de la cèl·lula beta pancreàtica en el pàncrees adult està detallat el l'apartat (2.1.1.) d'aquesta introducció i tot i que es tracta d'un camp que genera una important controvèrsia, tant pel que fa a quin és el tipus cel·lular progenitor, com sobre la importància dels mecanismes de neogènesi en l'adult, la regeneració pancreàtica representa una eina terapèutica molt esperançadora per la curació de la diabetis (Butler et al., 2010; Halban et al., 2010).

## **5.2. Teràpia substitutiva**

L'altre estratègia per substituir la massa beta perduda en la diabetis és la reposició de les cèl·lules productores d'insulina a partir d'una font externa.

### 5.2.1. Trasplantament de pàncrees

Fins ara l'única via pel restabliment de la normoglucèmia a llarg termini en malalts diabètics tipus 1 havia estat el trasplantament de pàncrees. Amb el trasplantament de pàncrees s'aporten les cèl·lules beta necessàries per a la producció d'insulina segons el requeriment fisiològic de l'organisme, evitant d'aquesta manera els problemes secundaris que resulten dels períodes d'hiperglucèmia i hipoglucèmia. Segons les últimes dades aparegudes al registre internacional de trasplantament de pàncrees (International Pancreas Transplant Registry) (Gruessner, 2011) s'han registrat més de 35.000 trasplantaments de pàncrees en tot el món. Actualment un 80% dels pacients trasplantats aconseguixen la insulino-independència durant un mínim de 3 anys (Berney et al., 2005). El trasplantament de pàncrees millora substancialment la qualitat de vida dels pacients i disminueix el risc d'aparició de complicacions com la nefropatia, neuropatia i retinopatia degudes a la diabetis (Fioretto et al., 1998; Navarro et al., 1997).

Ara bé, malgrat els resultats positius del trasplantament de pàncrees, s'ha de tenir en compte que es tracta d'un procediment quirúrgic complex i de risc. En l'actualitat tot i que el grau de mortalitat ha disminuït, es situa sobre el 5% el primer any després del trasplantament i sobre el 15% als 5 anys (Gruessner, 2011). També s'ha de tenir en compte que a més necessita una immunosupressió crònica del pacient que pot provocar risc d'infeccions, formació de tumors i complicacions renals a llarg termini (Pipeleers et al., 2002). Per tant, la relació riscos vs beneficis és superior respecte el tractament amb insulina, aquest fet en limita l'ús a pacients diabètics tipus 1 que necessiten un doble trasplantament, habitualment de ronyó, i que de totes maneres s'han de sotmetre a un tractament immunosupressor.

### 5.2.2. Trasplantament cel·lular

La DM1 és un candidat excel·lent per les teràpies de reemplaçament de cèl·lules degut a que està provocada per la falta d'un únic i ben definit tipus cel·lular: la cèl·lula beta. A més el trasplantar únicament les cèl·lules encarregades de censar la glucosa i secretar insulina pel restabliment de la massa beta perduda en la diabetis, representa una bona alternativa al trasplantament de pàncrees sencer. El trasplantament cel·lular suposa una intervenció de baix risc que es pot dur a terme en règim quasi ambulatori.

Existeixen diverses possibilitats per l'obtenció de cèl·lules productores d'insulina per la seva posterior implantació a receptors diabètics, entre les diferents fonts trobem els illots pancreàtics humans, bé propis, bé procedents de donants cadàver, l'expansió *ex-vivo* d'illots humans, els illots d'altres espècies o illots xenogènics, les cèl·lules productores d'insulina generades per bioenginyeria, com són les línees cel·lulars beta transformades, tant de rosegadors com humanes, les cèl·lules neuroendocrines i somàtiques transformades i finalment les cèl·lules mare embrionàries i adultes. De totes elles el trasplantament d'illots pancreàtics és l'única que en l'actualitat ha assolit un ús clínic.

### 5.2.2.1. Trasplantament d'illots pancreàtics

El trasplantament d'illots pancreàtics (Fig. 9) consisteix en aïllar els illots del pàncrees, bé del propi pàncrees per realitzar un autotrasplantament, bé d'un donant cadàver, per posteriorment infondre'ls en un pacient diabètic tipus 1. El trasplantament es realitza a través de la vena porta i els illots embolitzen en els sinusoides hepàtics on quedaran retinguts i des d'on secretaran insulina restablint la glucèmia del receptor.

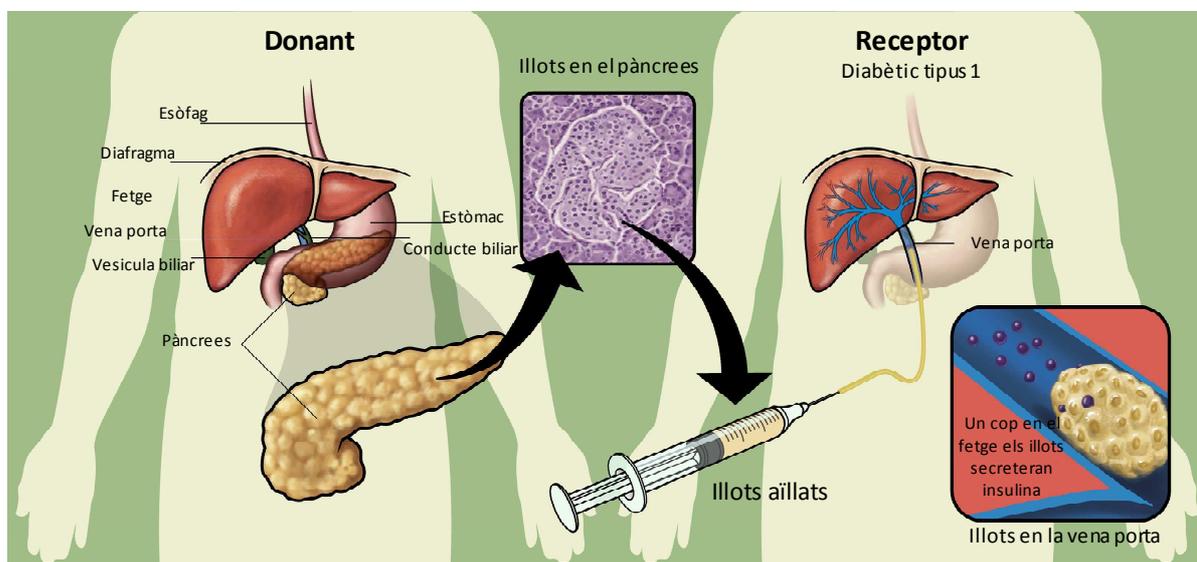


Figura 9. Il·lustració esquemàtica del trasplantament d'illots en humà. Modificat de (Naftanel and Harlan, 2004).

#### 5.2.2.1.1. *Antecedents històrics*

El trasplantament d'illots pancreàtics es va donar a conèixer a principis dels anys 70 quan Lacy i col·laboradors van aconseguir normalitzar la glucèmia de rates diabètiques mitjançant el trasplantament d'illots (Ballinger and Lacy, 1972). Al llarg dels anys 70 i 80 es va intentar reproduir en humans l'èxit assolit en animals d'experimentació sense obtenir resultats positius. No va ser fins els anys 90 quan es va aconseguir que pacients que havien rebut un trasplantament d'illots es mantinguessin normoglicèmics durant més d'un any després de la intervenció (Warnock et al., 1992). Tot i així dels pacients trasplantats durant la dècada dels 90 només el 12% van aconseguir la insulino-independència en algun moment i tan sols el 8% es van mantenir normoglicèmics durant més d'un any (White et al., 2000). Aquesta situació va canviar radicalment l'any 2000 quan Shapiro i els seus col·laboradors a Edmonton (Canadà) van aconseguir mantenir la normoglicèmia durant més d'un any al 100% de 7 pacients amb DM1 que havien estat trasplantats usant un nou protocol conegut com el "protocol d'Edmonton" (Shapiro et al., 2000). Dos anys després el 80% dels pacients trasplantats seguien sent insulino-independents, d'un total de 17 pacients trasplantats 15 portaven trasplantats més d'un any i 12 d'ells es mantenien insulino-independents, 6 d'aquests 15 ja feia més de dos anys que havien estat trasplantats i 4 seguien sent independents del tractament amb insulina (Ryan et al., 2005).

La clau de l'èxit del protocol d'Edmonton es va basar bàsicament en 2 punts: d'una banda el trasplantament d'un gran nombre d'illots, i de l'altra en la modificació de la pauta immunosupressora.

El nombre d'illots que va rebre cada pacient va ser d'aproximadament 800.000 illots, en un, dos o tres trasplantaments. 800.000 illots és una quantitat superior a la necessària per mantenir la normoglicèmia ja que l'autotrasplantament de 300.000 illots està associat a un 75% d'insulino-independència (Teuscher et al., 1998). A part de l'augment del nombre d'illots, es va millorar la qualitat d'aquests evitant l'ús de productes que continguessin xenoproteïnes per la seva obtenció, també es va minimitzar el temps d'isquèmia freda abans del trasplantament. El punt determinant per l'èxit del grup d'Edmonton va ser, però, el canvi en la pauta immunosupressora, en especial l'eliminació dels fàrmacs que contenien glucocorticoides. Els glucocorticoides afecten la funció i la supervivència de les cèl·lules beta pancreàtiques ja

que s'acumulen al fetge, emplaçament dels illots trasplantats per embolització portal transhepàtica percutània.

Les expectatives generades per aquest èxit van disminuir amb la publicació dels resultats a 5 anys, que mostraven que només el 10% dels pacients trasplantats es mantenien insulino-independents. No obstant, al voltant del 80% dels pacients amb funció inicial de l'empelt d'illots la mantenien als 5 anys del trasplantament, fet que els permetia gaudir d'un bon control metabòlic amb reduïdes dosis d'insulina (Ryan et al., 2005).

Aquests resultats van ser parcialment reproduïts en un estudi multicèntric internacional, l'*International Network Trial (ITN)* (Shapiro et al., 2006). Els 9 centres que van participar en l'estudi, 6 a Nord Amèrica i 3 a Europa, van utilitzar el protocol d'Edmonton, però la seva experiència prèvia en el trasplantament d'illots anava de nul·la a molt elevada. En total es van trasplantar 36 pacients. Un any després del trasplantament el 44% es mantenien insulino-independents i presentaven un control glucèmic adequat, el 28% mantenien parcialment la funció de l'empelt i el 28% restant l'havien perdut completament. Dos anys després del trasplantament només el 31% dels pacients trasplantats que s'havien mantingut insulino-independents al llarg del primer any després del trasplantament, continuaven mantenint la funció de l'empelt.

Estudis més recents han presentat una milloria en els resultats a llarg termini. El 2009 es van publicar els resultats d'un assaig clínic en fase II en el que s'havien trasplantat illots a catorze pacients (Vantyghem et al., 2009). Després del trasplantament tots els pacients van assolir la insulino-independència i el 64% presentaven un control òptim de la glucèmia. Als tres anys el 57% dels pacients trasplantats continuaven sent independents de la insulina.

En definitiva, el trasplantament d'illots permet assolir la insulino-independència a curt-mitjà termini, i el fet que l'empelt mantingui la producció d'insulina evita les hipoglucèmies i millora l'estabilitat de la glucèmia, inclús en aquells en que és necessària la coadministració d'insulina exògena.

#### 5.2.2.1.2. *Limitacions del trasplantament d'illots pancreàtics*

La limitada disposició d'òrgans per portar a terme l'aïllament i posterior trasplantament d'illots pancreàtics, juntament amb la necessitat de tractament immunosupressor, continua sent un

dels impediments més importants que limita el trasplantament d'illots. Malgrat que Espanya és capdavantera mundial en el nombre de donants d'òrgans i presenta xifres creixents al llarg dels anys, les donacions són clarament insuficients per tractar el nombre de malalts amb DM-1, que es situa sobre els 100.000, ni tan sols serien suficients per trasplantar els 2000 nous malalts que són diagnosticats cada any. A aquestes limitacions cal afegir-hi la necessitat d'utilitzar dos o més pàncrees per a trasplantar un únic pacient amb èxit, donada la baixa eficiència del procés d'aïllament i la important pèrdua inicial de teixit trasplantat, agreujant encara més la situació.

El baix rendiment del procés d'aïllament s'ha d'atribuir, entre d'altres factors, a la llarga i important manipulació que implica, als enzims utilitzats per realitzar la digestió del pàncrees, que presenten certa activitat endotoxina, i a la toxicitat dels gradients de ficoll que s'utilitzen per purificar els illots. Aquests tres factors són determinants per explicar la gran variabilitat existent entre aïllaments pel que fa a la qualitat, nombre i puresa dels illots obtinguts. Però no s'ha de menystenir la variabilitat introduïda en el procés d'obtenció del pàncrees, dels donants i del propi pàncrees, factors que també influeixen de manera determinant en el resultat de l'aïllament.

Diversos grups han demostrat que l'activitat endotoxina present en alguns dels reactius utilitzats durant l'aïllament dels illots pot estimular l'expressió de citocines proinflamatòries per part dels macròfags residents als illots (Jahr et al., 1995; Jahr et al., 1999; Vargas et al., 1998). Les citocines afavoririen la migració dels monòcits i polimorfonuclears que expandirien la resposta inflamatòria local, que al seu torn, podria estar reforçada per la producció d'òxid nítric (NO) per part dels macròfags i altres tipus cel·lulars (Montolio et al., 2007a). Paral·lelament el NO podria també provocar la pèrdua de funció de les cèl·lules beta pancreàtiques (Stevens et al., 1996).

La necessitat d'utilitzar més d'un pàncrees per a trasplantar un únic pacient es deu també a la important pèrdua de massa cel·lular beta que es produeix després del trasplantament i que principalment es pot atribuir a tres processos:

El rebuig agut de l'empelt al·logènic. La destrucció de l'empelt d'illots és deguda a un atac immunològic en el que intervenen 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 (Ricordi et al., 1992; Scharp et al., 1991) i INF $\gamma$  (Diamond and Gill, 2000).

La pèrdua primària de la funció de l'empelt (primary nonfunction, PNF). La pèrdua primària de funció dels illots trasplantats es deu a causes independents al rebuig immunògenic. Ha estat descrit que els primers dies després del trasplantament els illots trasplantats no són completament funcionals, fet que s'ha associat a una inflamació no específica produïda en el lloc d'implantació i a la manca de vascularització dels illots.

Els illots pancreàtics endògens estan molt ben vascularitzats i tot i que només representen entre l' 1-2% de la massa de cèl·lules pancreàtiques, reben del 5-10% del flux de la sanguini del pàncrees (Lifson et al., 1980). La microvasculatura de l'illot es molt densa i constitueix una complexa xarxa vascular que garanteix un subministrament òptim d'oxigen i nutrients a les cèl·lules dels illots, ara bé, quan els illots pancreàtics són aïllats de la resta del pàncrees, les connexions vasculares i nervioses es trenquen. Com a conseqüència es trasplanten agregats d'illots avasculares que es troben en situació d'hipòxia i depenen de l'oxigen i la difusió de nutrients de l'espai intercel·lular fins que la xarxa vascular es restableix. En rosegadors l'angiogènesi inicial sol començar entre el segon i quart dia després del trasplantament d'illots, quan té lloc la captació i l'estimulació de la proliferació de les cèl·lules endotelials, però no serà fins 14 dies després del trasplantament que els illots trasplantats estaran novament revascularitzats (Menger et al., 2001). Per tant, la hipòxia que té lloc inicialment després del trasplantament, deguda a la pèrdua de les connexions vasculares durant el procés de l'aïllament, juga un paper clau en el dany precoç de l'empelt, afectant no només el metabolisme cel·lular sinó també la viabilitat dels illots trasplantats (Davalli et al., 1996).

La recurrència de l'autoimmunitat. La pèrdua de funció de l'empelt també pot donar-se per la recurrència de l'autoimmunitat contra les cèl·lules beta trasplantades. Com s'ha descrit en l'apartat (3.2) d'aquesta tesi, la diabetis tipus 1 és una malaltia autoimmunitària que es caracteritza per la destrucció selectiva de les cèl·lules beta. Un cop les cèl·lules beta han estat destruïdes l'enfermetat entra en un estat de "quiescència", ara bé, una nova exposició al teixit insular beta, com es dona en el cas del trasplantament d'illots pancreàtics, pot desencadenar novament la recurrència de l'autoimmunitat degut a la presència de cèl·lules T autorreactives específiques contra les cèl·lules beta de l'illot. La destrucció autoimmune de les cèl·lules beta

dels illots trasplantats en pacients diabètics tipus 1, és per tant un altre factor que contribueix al resultat del trasplantament d'illots.

#### 5.2.2.1.3. *Perspectives i trasplantament experimental d'illots*

Malgrat el trasplantament d'illots és una teràpia potencialment esperançadora presenta diverses limitacions importants que cal solventar, com són l'obtenció d'illots de bona qualitat, evitar la pèrdua de la massa cel·lular beta després del trasplantament i millorar la pauta immunosupressora.

Paral·lelament als reptes assolits en el trasplantament clínic d'illots, els models experimentals de trasplantament en rosegadors suposen una important font de coneixements per poder avançar en la millora del trasplantament d'illots pancreàtics.

Aquests models experimentals permeten, d'una banda, analitzar i entendre com evoluciona la massa beta trasplantada, i de l'altra, testar noves estratègies destinades al manteniment del teixit beta trasplantat, i finalment i de manera més general, estudiar les cèl·lules endocrines en un entorn *in vivo*.

El nostre grup ha descrit que la pèrdua de funció primària de l'empelt està determinada per la mort d'entre el 60-70% de la massa beta trasplantada els primers dies després del trasplantament d'illots. Aquesta mort inicial es pot atribuir tant a processos de necrosi com d'apoptosi que no poden ser contrarestats per la replicació de les cèl·lules beta durant aquest període inicial post-trasplantament (Biarnés et al., 2002). De fet, el nostre grup ha descrit la inflamació primària que es dona els primers dies després del trasplantament durant la qual s'indueix l'expressió de diverses citocines proinflamatòries entre les que trobem la IL-1 $\beta$  i el TNF $\alpha$ , que són ben conegudes pels seus efectes deleteris sobre les cèl·lules beta pancreàtiques (Montolio et al., 2007a). També hem demostrat que en els primers dies després del trasplantament, i com a resposta a la lesió provocada pel procés, s'indueix l'expressió de diversos gens tant pro com anti-apoptòtics (Rodríguez-Mulero and Montanya, 2008).

En conseqüència, ens hem proposat estudiar possibles mecanismes capaços de contrarestar la mort inicial que es dona els primers dies després del trasplantament, concretament evitant

l'apoptosi i incrementant la supervivència de les cèl·lules beta, augmentar-ne la replicació i potenciar-ne la neogènesi i la regeneració.

En aquest sentit hem estudiat la inhibició de l'apoptosi i l'augment de la replicació en els empelts mitjançant el trasplantament d'illots pancreàtics prèviament pre-incubats amb inhibidors de caspases (Montolio et al., 2005), illots que sobreexpressaven factors inhibidors de determinades citocines (Téllez et al., 2007) o administrant anàlegs d'hormones glucoreguladores (Joanny G, tesi doctoral 2011).

#### 5.2.2.2. Fonts alternatives de cèl·lules productores d'insulina

Degut a la limitació del teixit del que es disposa per realitzar el trasplantament d'illots pancreàtics i la important pèrdua de massa beta que es dona després del trasplantament, els darrers anys s'han desenvolupat diverses i prometedores aproximacions per la generació de noves cèl·lules productores d'insulina. Aquestes aproximacions inclouen, l'expansió de cèl·lules beta, la diferenciació directa de cèl·lules pluripotencials com són les cèl·lules mare embrionàries (ES), o la reprogramació de cèl·lules de teixits madurs com són les cèl·lules mare pluripotencials induïdes (iPS). S'han establert mètodes d'alt rendiment per diferenciar poblacions cel·lulars a cèl·lules productores d'insulina amb factors de creixement i molècules petites. Ara bé, encara no s'ha obtingut *in vitro* el pas final de diferenciació dirigida a generar cèl·lules productores d'insulina funcionals i madures en quantitats suficients.

S'ha de considerar que conjuntament amb les necessitats pel trasplantament, una font renovable de cèl·lules beta també seria important per l'estudi de la patogènesi de la diabetis i la recerca de tractaments alternatius. A més, mitjançant la generació de noves cèl·lules beta es podrien conèixer més detalls sobre el desenvolupament del pàncrees i la diferenciació cap a cèl·lula beta.

##### 5.2.2.2.1. Expansió *in vitro* de cèl·lules beta

La necessitat de desenvolupar estratègies dirigides a generar cèl·lules productores d'insulina en quantitats abundants, que permetin una aplicació més àmplia del trasplantament pel

tractament de la diabetis, ha fet pensar en l'expansió de cèl·lules beta primàries humanes com a potencial font pel subministra de grans quantitats de cèl·lules productores d'insulina (Gershengorn et al., 2004; Ouziel-Yahalom et al., 2006; Parnaud et al., 2008). Ara bé, un dels majors obstacles per la seva consecució és el fet que les cèl·lules beta són difícils de mantenir i no es divideixen en cultiu. *In vivo*, les cèl·lules beta humanes mostren una capacitat de proliferació molt baixa. *In vitro*, illots aïllats poden ser cultivats en suspensió durant mesos, però, tot i que segueixen sent funcionals, no proliferen (Nielsen et al., 1979). Tanmateix, quan es permet l'adhesió dels illots, es pot induir la replicació de les cèl·lules beta amb factors de creixement, per exemple amb el factor de creixement hepatocitàri (HGF)/scatter factor (SF), o components de la matriu extracel·lular (ECM). Ara bé, aquestes aproximacions tot i resultar en un increment en el nombre de cèl·lules, es veuen limitades per la senescència cel·lular i la pèrdua del fenotip cel·lular beta i de la funció diferenciada, són cèl·lules que no expressen insulina (Beattie et al., 1999; Beattie et al., 2000; Beattie et al., 2002). Aquestes cèl·lules insulina negatives, similars a fibroblasts, que es fan evidents després de la pèrdua gradual del fenotip beta en cultius a llarg termini, tenen la capacitat de proliferar i expandir-se, i fins i tot poden produir petites quantitats d'insulina al induir la seva diferenciació. S'ha hipotetitzat que les cèl·lules beta madures poden patir una transició epiteli-mesènquima (EMT) (Gershengorn et al., 2004; Ouziel-Yahalom et al., 2006) donant lloc a una població de cèl·lules fibroblastoides proliferatives després de l'expansió, que posteriorment, podrien ser induïdes a rediferenciar-se en cèl·lules productores d'insulina. Tot i que en un principi, la hipòtesi que les cèl·lules beta madures poden patir una EMT no va poder ser confirmada (Billestrup and Otonkoski, 2008), més recentment, l'ús de tècniques de marcatge genètic, que permeten fer un seguiment d'un llinatge cel·lular concret, ha permès demostrar convincentment que les cèl·lules humanes expandides que expressen un fenotip mesenquimal deriven directament de cèl·lules beta (Russ et al., 2008; Russ et al., 2009) i es pot induir la proliferació en cultiu d'aquestes cèl·lules mesenquimals desdiferenciades negatives per insulina fins a 16 duplicacions. El procés de la EMT en les cèl·lules beta de l'illot és probablement una conseqüència de la dissociació de cèl·lules de l'illot en cèl·lules individuals, donant com a resultat contactes cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu alterats. La pèrdua dels contactes cel·lulars després de la dispersió dels illots molt probablement condiciona canvis importants en l'expressió de gens responsables del manteniment del fenotip cel·lular beta i l'activació de marcadors mesenquimals. La qüestió fonamental que queda per resoldre és com aconseguir la rediferenciació de les cèl·lules

expandides tipus mesenquimals cap a cèl·lules amb un fenotip de cèl·lula beta madura. Pel que fa a la reagregació de les cèl·lules expandides, que sembla ser important per al procés de rediferenciació, la informació que es té és limitada tot i que recentment s'han assolit progressos força encoratjadors (Russ et al., 2011).

#### 5.2.2.2. *Obtenció de cèl·lules productores d'insulina a partir de cèl·lules mare embrionàries*

La diferenciació de les cèl·lules mare (ES) embrionàries en cèl·lules productores d'insulina ha estat objecte d'una intensa recerca en els darrers anys. Ara bé, malgrat el gran potencial d'aquesta font de cèl·lules potencialment il·limitada, la tasca resulta ser molt difícil. La majoria dels protocols han intentat imitar les etapes en el desenvolupament del pàncrees de ratolí utilitzant combinacions de proteïnes recombinants humanes per activar o bloquejar vies de senyalització específiques. El procés de diferenciació es basa, a grans trets, en quatre passos principals: 1. Inducció de l'endoderma definitiu. 2. Compromís de l'endoderma cap a destí pancreàtic. 3. Diferenciació de progenitors de pàncrees a progenitors Ngn3<sup>+</sup>. 4. Diferenciació en cèl·lules productores d'insulina. Ara bé, malgrat els successius avenços que han permès incrementar la consistència dels resultats, l'eficiència de la diferenciació segueix sent bastant baixa, i els resultats han estat difícils de reproduir en múltiples línies de cèl·lules pluripotents.

Les cèl·lules productores d'insulina generades *in vitro* a partir de cèl·lules mare embrionàries humanes resulten immadures, tal com es manifesta per l'expressió de diverses hormones dels illots i la falta de resposta a la glucosa. Pel contrari, el trasplantament de cèl·lules ES humanes derivades de cèl·lules progenitores pancreàtiques Pdx1<sup>+</sup> a ratolins immunodeficients resulta en la diferenciació a cèl·lules productores d'insulina funcionals (Kroon et al., 2008; Rezanian et al., 2012; Schulz et al., 2012). L'èxit de la diferenciació obtingut *in vivo* posa de relleu les deficiències amb els protocols *in vitro* que, probablement, fallen en imitar els elements clau de l'organogènesi normal, com ara l'equilibri entre la replicació cel·lular i la diferenciació en les etapes intermèdies, les interaccions complexes entre els diversos tipus cel·lulars, la sincronització exacta, la intensitat i la durada de cada estímul morfogènic.

Un altre element que complica la interpretació dels estudis de diferenciació *in vitro* és l'heterogeneïtat de les poblacions de cèl·lules en fases intermèdies, el que probablement inclou cèl·lules bloquejades en etapes anteriors de diferenciació. És probable que el treball

amb poblacions homogènies permeti avançar en el desenvolupament de protocols de diferenciació més eficients i redueixi el risc de tumorigenicitat associada amb el trasplantament de les poblacions de cèl·lules heterogènies que contenen cèl·lules pluripotents no diferenciades.

Un altre desavantatge per l'obtenció d'un únic tipus cel·lular a partir de les cèl·lules mare pluripotents és la depleció en els cultius cel·lulars d'altres tipus de cèl·lules, que en el desenvolupament embrionari normal poden formar un microambient crucial per a la diferenciació de les cèl·lules dels illots. En els rosegadors, durant el desenvolupament l'epiteli pancreàtic interactua estretament amb les cèl·lules mesenquimals, que secreten múltiples factors que regulen el desenvolupament pancreàtic. Entre aquests factors, el factor de creixement de fibroblasts 10 s'ha demostrat que es requereix per a l'expansió de cèl·lules progenitores de pàncrees (Attali et al., 2007).

#### 5.2.2.2.3. *Obtenció de cèl·lules productores d'insulina a partir de cèl·lules pluripotencials induïdes (iPS)*

A principis dels anys 2000 va sorgir la idea de generar cèl·lules mare pluripotencials, similars a les embrionàries, a partir de cèl·lules somàtiques adultes. La inducció de pluripotencialitat a les cèl·lules adultes evita, per un cantó, els conflictes ètics existents respecte la utilització de cèl·lules embrionàries humanes i per l'altre, la limitació que representa el rebuig a l'empelt al·logènic, ja que es podrien realitzar autotrasplantaments.

La transferència nuclear de cèl·lules somàtiques (SCNT, de l'anglès Somatic Cell Nuclear Transfer), desenvolupada durant els anys 60, va demostrar que el nucli d'una cèl·lula adulta diferenciada es podia reprogramar cap a un estat totipotent quan s'injectava en un oòcit anucleat. Tenint en compte aquesta capacitat que tenen les cèl·lules adultes per ser reprogramades, l'any 2007, el grup de Yamanaka va demostrar, per primer cop, que les cèl·lules somàtiques adultes podien revertir a un estat pluripotencial mitjançant la inserció de 4 gens: Oct4, Sox2, c-Myc i Klf4. A més, aquestes cèl·lules es podien diferenciar cap a cèl·lules dels diferents llinatges seguint els protocols de diferenciació utilitzats per les cèl·lules mare embrionàries (Takahashi et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006).

Actualment, s'han aconseguit reprogramar fibroblasts adults provinents de pacients diabètics inserint, només, 3 factors de transcripció, Oct-4, Sox2 i Klf4. L'eliminació de cMyc de la barreja inicial ha estat possible per l'addició d'un inhibidor de la histona deacetilasa 1 (HDAC1, de l'anglès Histone Deacetylase 1), l'àcid valproic (Maehr et al., 2009). A més, aquestes cèl·lules poden derivar cap a cèl·lules productores d'insulina (revisat per Borowiak i Melton (Borowiak and Melton, 2009)).

#### 5.2.2.2.4. Transdiferenciació de cèl·lules no beta a cèl·lules productores d'insulina

Com s'ha comentat en l'apartat (2.1.1.) d'aquesta introducció, els models de lesió pancreàtica suggereixen que les cèl·lules de l'epiteli ductal podrien retenir la capacitat progenitora per diferenciar-se cap a cèl·lules beta pancreàtiques. A més, en algun cas s'ha observat transdiferenciació cap a cèl·lula beta a partir de cèl·lules similars a ducte ("duct-like cells") presents en el teixit pancreàtic metaplàsic que eventualment podrien tenir un origen acinar. Així doncs, es tractaria d'una transdiferenciació acino-endocrina passant per un fenotip ductal intermig. Aquests indicis van portar a estudiar la capacitat de les cèl·lules ductals i de les cèl·lules acinars per donar lloc a cèl·lules beta en cultiu.

Tot i que cal considerar que les condicions en cultiu són radicalment diferents a les que s'obtenen en els models *in vivo* i que, per tant, l'extrapolació de resultats presenta certes limitacions, aquesta aproximació permet analitzar de manera més acurada, el paper concret de certes molècules sobre la plasticitat cel·lular i a més, estudiar el comportament del teixit pancreàtic humà.

El cultiu enriquit de cèl·lules acinars passa per una sèrie d'estadis que presenten un perfil d'expressió gènica i proteica concret i diferent per cada estadi. Inicialment la major part de cèl·lules expressen amilasa, lipasa i Ptf1a-p48 (de l'anglès pancreas specific bHLH transcription factor), que correspon al patró d'expressió proteica de les cèl·lules acinars. Posteriorment, passen a expressar marcadors clarament ductals que en presència del EGF (de l'anglès Epidermal growth factor) i LIF (de l'anglès Leukemia inhibitory factor) en el medi de cultiu, acabaran expressant marcadors de cèl·lula beta diferenciada (revisat per Baeyens i Bowens (Baeyens and Bouwens, 2008)). En el procés de transdiferenciació acino-ductal-insular sembla que el contacte cèl·lula-cèl·lula, mitjançant les proteïnes d'adhesió dependents de Calci,

Cadherines, podria jugar un paper important, ja que l'expressió d'E-Cadherina en les cèl·lules acinars és necessària per la transdiferenciació acino-insular (Minami et al., 2008). De la mateixa manera que el bloqueig de la via de senyalització de Notch, descrit per la diferenciació de les cèl·lules endocrines durant el desenvolupament pancreàtic en l'embrió (Miralles et al., 2006; Parsons et al., 2009), i que també és un requeriment per obtenir cèl·lules beta a partir del cultiu de cèl·lules acinars (Baeyens et al., 2009).

D'altra banda, també s'han obtingut cèl·lules beta pancreàtiques a partir del cultiu de cèl·lules ductals (Bonner-Weir et al., 2000; Gao et al., 2005). En aquest cas el mètode utilitzat per obtenir el cultiu primari de les cèl·lules ductals determina, en part, el rendiment del procés de transdiferenciació. Quan el cultiu inicial està format per cèl·lules ductals que representen un 90% de puresa, el nombre de cèl·lules beta obtingudes al final del procés és considerablement més baix que si es parteix d'un cultiu heterogeni que conté una part de cèl·lules d'origen mesenquimal (Yatoh et al., 2007). Aquestes cèl·lules mesenquimals, que provenen de l'estroma pancreàtic, podrien secretar factors inductors de la diferenciació pels quals, les cèl·lules ductals en serien diana i respondrien diferenciant-se cap a un fenotip cel·lular beta pancreàtic. Aquesta hipòtesi es recolza en la, ja coneguda, interacció epiteli-mesenquima que és requerida per una correcta formació del patró d'estructuració de les cèl·lules embrionàries per formar els teixits i per l'adequada morfogènesi de l'endoderm pancreàtic durant la formació del pàncrees embrionari (Ahnfelt-Rønne et al., 2010; Ball and Risbridger, 2001; Duvillié et al., 2006; Duvillié et al., 2008; Scharfmann et al., 2008).

Fins ara s'ha parlat de la plasticitat de les cèl·lules pancreàtiques, de la capacitat que tenen per diferenciar-se cap a un fenotip beta *in vitro*, sense necessitat de modificar forçadament la seva genètica, però també cal mencionar que aplicant tècniques de modificació genètica, s'han obtingut cèl·lules productores d'insulina a partir de cèl·lules hepàtiques (Ber et al., 2003; Ferber et al., 2000). Concretament, la inducció d'expressió de Pdx-1 en les cèl·lules hepàtiques mitjançant transferència gènica, afavoreix l'expressió d'insulina i de les proteïnes de la maquinària secretora resultant en una població de cèl·lules beta funcionals (Sapir et al., 2005).

En conjunt doncs, podem dir que en els darrers anys s'ha assolit un progrés considerable en diversos enfocaments orientats al desenvolupament de noves fonts de cèl·lules beta humanes. La demostració de la rediferenciació de les cèl·lules beta propagades en cultiu ha proporcionat mitjans per a l'expansió significativa del nombre limitat d'aquestes cèl·lules per el

trasplantament. L'aïllament de les cèl·lules en etapes intermèdies entre les cèl·lules mare pluripotents humanes i les cèl·lules productores d'insulina, juntament amb la capacitat d'expandir-les, és probable que proporcioni noves eines per a l'optimització del protocol de diferenciació. La identificació de possibles elements bloquejants epigenètics en la generació *in vitro* de cèl·lules beta pot donar lloc a millores del protocol dissenyat per superar-los. Els avenços en la comprensió de la reprogramació cel·lular no-beta a beta en ratolins pot obrir el camí per a l'avanç d'aquest enfocament en els respectius tipus de cèl·lules humanes *in vivo* o *ex vivo*.

En definitiva, els resultats obtinguts fins al moment són prometedors i porten a pensar que cada cop estem més a prop de la generació de cèl·lules beta, productores d'insulina, en el laboratori. De totes maneres existeixen varies limitacions que encara s'han de superar, com és aconseguir unes cèl·lules beta totalment diferenciades. Les cèl·lules que resulten dels protocols de diferenciació de les cèl·lules pluripotencials, tant les induïdes com les embrionàries, expressen i secreten insulina en resposta a glucosa, però a uns nivells molt més baixos dels que ho fan les cèl·lules beta madures. L'expressió de més d'una hormona per part d'aquestes cèl·lules, normalment insulina i glucagó, i la manca d'expressió de factors de transcripció claus pel correcte funcionament de la cèl·lula beta, com MafA, fan que aquestes cèl·lules es caracteritzin com a desdiferenciades. Per tant, les cèl·lules beta generades mitjançant els diversos enfocaments s'hauran de comparar enfront de les cèl·lules beta normals pel que fa al seu perfil d'expressió gènica, la producció d'insulina, la secreció regulada i l'estabilitat fenotípica. Treballs recents han proporcionat una detallada caracterització del transcriptoma de les cèl·lules dels illots humans, del perfil de microRNAs, del proteoma, i l'epigenoma, el que permet conèixer quan de similar és cada població de cèl·lules productores d'insulina obtinguda.

Així doncs, malgrat és necessari avançar tant en el coneixement de la plasticitat cel·lular, característica de les cèl·lules eucariotes d'un elevat potencial terapèutic, com en l'obtenció de cèl·lules beta secretores d'insulina, el major obstacle al que s'enfronten les noves estratègies terapèutiques aplicades a la diabetis segueix sent l'atac autoimmune contra les cèl·lules beta que es dona en els pacients diabètics tipus 1. En aquest sentit, l'encapsulació cel·lular ha estat vista durant molt de temps com una estratègia prometedora, però segueix veient-se obstaculitzada per problemes com la falta d'oxigen i nutrients i una lenta cinètica de la secreció d'insulina en resposta a secretagogs. Un recent estudi sobre un dispositiu d'encapsulació

equipada amb la seva pròpia càmera d'oxigen (Ludwig et al., 2012) representa un pas endavant en els esforços per desenvolupar encara més aquest enfocament de protecció.

Per últim, remarcar que, tot i que la generació de cèl·lules productores d'insulina a partir de cèl·lules mare és una alternativa prometedora, és improbable que els coneixements que es tenen actualment en aquest camp permetin obtenir en els propers anys una font il·limitada de cèl·lules productores d'insulina vàlida per ús clínic, pel que és possible que el trasplantament d'illots segueixi sent a curt plaç l'única teràpia cel·lular substitutiva aplicable clínicament al tractament de la diabetis.

### **5.3. Teràpia gènica.**

Es podria definir la teràpia gènica com la transferència de material genètic a les cèl·lules d'un organisme amb finalitat terapèutica. El material genètic introduït ha de contenir una còpia del gen d'interès i els elements que controlen la seva expressió. La transferència de gens pot ser realitzada *ex vivo* o *in vivo* i comporta diferents etapes: La unió del DNA a la cèl·lula, la seva internalització, el transport a l'interior del nucli cel·lular i finalment, la transcripció i expressió de la proteïna. En la teràpia gènica *in vivo* el material genètic s'introdueix en un vector i s'administra directament al pacient, en la teràpia *ex vivo* el DNA és introduït en un vector el qual es transfereix en les cèl·lules prèviament aïllades, que posteriorment seran reintroduïdes a l'organisme. També cal considerar que les manipulacions genètiques poden realitzar-se en les cèl·lules de la línia germinal, i per tant es transmetran a la descendència, o bé en la línia somàtica i d'aquesta manera tindran efectes únicament sobre l'individu tractat. La teràpia gènica és bàsicament una teràpia somàtica.

En principi la teràpia gènica es va considerar una eina bàsica pel tractament d'enfermetats hereditàries monogèniques, amb la finalitat de tornar a les cèl·lules la capacitat de produir la proteïna funcional mitjançant la transferència d'una còpia correcte del gen. Ara bé, en l'actualitat la majoria de les aplicacions de teràpia gènica s'estan desenvolupant per malalties d'alta prevalença, ja siguin poligèniques o no hereditàries, com per exemple el càncer o el SIDA. Per tant, la diabetis, tant la tipus 1 com la tipus 2, pot considerar-se una bona candidata per ser tractada amb estratègies de teràpia gènica.

En cada cas, per aconseguir l'efecte terapèutic desitjat, l'estratègia de teràpia gènica més adequada vindrà determinada pel problema a tractar: A) introducció d'una còpia normal d'un gen defectiu per restaurar la producció d'una proteïna no produïda o no funcional. B) expressió de determinat gen d'interès que pot actuar estimulante, inhibint, potenciant o contrarestant els efectes d'altres proteïnes de l'organisme. C) incorporació de *gens suïcides* els quals són introduïts a les cèl·lules que es volen eliminar i les sensibilitzen contra substàncies específiques, que al ser administrades provoquen la destrucció selectiva de les cèl·lules que expressen el gen forà. D) introducció de seqüències d'oligonucleòtids o fragments de RNA antisentit que inhibiran l'expressió del gen seleccionat.

Així doncs, per desenvolupar una nova estratègia de teràpia gènica per la diabetis, cal seleccionar el gen terapèutic a utilitzar en funció de si volem, per exemple, regenerar el pàncrees, mantenir la normoglucèmia o bloquejar la neovascularització de la retina, etc. Per tant, l'elecció del gen a transferir dependrà del mecanisme sobre el qual volem actuar.

### 5.3.1. Vectors per teràpia gènica

La introducció de gens com a teràpia gènica requereix la utilització de vehicles, vectors d'expressió, que encapsulen el material genètic i el guien cap a la cèl·lula diana. Els vectors representen també un element clau per la teràpia gènica. Actualment els vectors es classifiquen en: virals (d'origen biològic) i no virals (d'origen fisicoquímic). D'entre els vectors virals trobem: adenovirus, virus adenoassociats, retrovirus, lentivirus i Herpes Simplex Virus. Entre els diversos mètodes no virals: coprecipitació amb fosfat càlcic, lípids i polímers catiónics, administració directa del DNA, electroporació i *gene gun*. Cada tipus de vector presenta diferents característiques, per tant, el tipus d'estratègia i de vector a utilitzar vindrà determinada per l'objectiu que es vol assolir, la duració de l'expressió del gen terapèutic que es necessiti, així com per les característiques del teixit i dels tipus cel·lulars a tractar. En definitiva, no es pot afirmar quin és el vector ideal pel tractament de la diabetis ja que la seva elecció dependrà en cada cas de la estratègia a desenvolupar, del teixit al que es vol accedir, al temps que dura l'expressió del gen curatiu i de si es tracta d'una aproximació *in vivo* o *ex vivo*.

#### 5.3.1.1. Vectors no virals.

Els vectors no virals, com els plasmids, els quals contenen el gen d'interès, un promotor i un senyal de poliadenilació, poden utilitzar-se per introduir gens en diferents tipus cel·lulars, però la seva aplicació *in vivo* no ha tingut gaire bons resultats donada la baixa eficiència en l'entrada del plasmid dins la cèl·lula, bàsicament degut a la baixa capacitat de les cèl·lules per captar el DNA. Ara bé, existeixen diversos mètodes físics i químics que permeten incrementar l'eficiència de l'entrada del DNA dins la cèl·lula. L'electroporació o aplicació de polsos elèctrics, després de la injecció intratisular d'un plàsmid, és molt prometedora. Els polsos elèctrics desestabilitzen la membrana i permeten una major entrada del plasmid a la cèl·lula, a més els gens que conté el vector poden expressar-se durant mesos. Es tracta d'una tècnica simple, econòmica i segura. De manera similar es poden utilitzar ultrasons per incrementar la incorporació del DNA dins les cèl·lules, aquest procés s'anomena sonoporació. Les principals avantatges de l'ús de vectors no virals són la possibilitat de transferir gens de gran tamany i que pràcticament no desencadenen cap resposta immunitària. Ara bé, els protocols aprovats per la pràctica clínica utilitzen vectors virals degut a la baixa transferència gènica obtinguda amb els vectors no virals.

#### 5.3.1.2. Vectors virals

Els vectors virals aprofiten la capacitat natural dels virus per infectar un determinat tipus cel·lular i transferir el material genètic al nucli de la cèl·lula. Aquests vectors tenen delecionades les regions responsables de la replicació del virus, eliminant d'aquesta manera la seva patogenicitat i permetent la introducció dels gens d'interès, ja que la seva capacitat per entrar a les cèl·lules i transportar el DNA es mantenen intactes

Els vectors virals es poden classificar en 1) vectors integratius: que tenen la capacitat d'insertar el gen d'interès en el genoma cel·lular, el que permet l'expressió del gen terapèutic a llarg plaç i la seva transferència a les cèl·lules filles al dividir-se la cèl·lula transfectada. 2) vectors no integratius: en que el material genètic es manté de forma episomal en la cèl·lula infectada, i per tant, la seva l'expressió depèn bàsicament de la taxa de replicació del tipus cel·lular transfectat.

D'entre els vectors integratius els més utilitzats inicialment van ser els retrovirus derivats de oncorretrovirus murins, si bé tant sols tenen la capacitat d'infectar cèl·lules en divisió. Actualment els lentivirus, que són retrovirus derivats del virus de la immunodeficiència humana (VIH), estan guanyant terreny als retrovirus. Els vectors lentivirals, a diferència dels retrovirus, poden infectar tant cèl·lules quiescents com cèl·lules en divisió, i es poden utilitzar en teràpies *ex vivo* i *in vivo*. Aquests vectors poden contenir gens exògens de fins a 8 kb.

Pel que fa als vectors no integratius, els més àmpliament utilitzats són els adenovirus (Ad) i els vectors adenoassociats (AAV), que poden infectar cèl·lules quiescents i cèl·lules en divisió.

Els vectors adenovirals de primera generació permeten l'expressió d'elevats nivells de gens exògens de manera transitòria, però al mantenir l'expressió d'algunes proteïnes virals resulten immunogènics. En els següent apartat farem una completa revisió d'aquests vectors ja que són els utilitzats en aquesta tesi per la transducció de les cèl·lules dels illots.

En els adenovirus d'última generació, *gut-less o helper-depender*, els gens virals s'han eliminat completament, i per tant són poc immunogènics i permeten l'expressió a més llarg plaç dels gens exògens. Aquests vectors tenen una gran capacitat de clonatge respecte els adenovirus de primera generació (36 kb vs 8kb respectivament). La contrapartida és que la seva producció resulta molt complicada.

Els vectors AAV deriven de virus adeno-associats, que van ser identificats com a virus contaminants de preparacions d'adenovirus. Els AAV necessiten d'altres virus per replicar-se (adeno o herpes virus). Actualment s'han obtingut varis serotips d'AAV que presenten diferent tropisme cel·lular i que poden seleccionar-se depenent del tipus cel·lular en el que es vulgui expressar el gen terapèutic. A més, els AAV es poden produir fàcilment i en models animals no generen resposta immune i la seva expressió es manté a llarg plaç. La limitació d'aquests vectors és la baixa capacitat d'empaquetament. Els AAV només poden contenir gens de fins 4.5 kb.

<b>Vectors</b>	<b>Avantatges</b>	<b>Inconvenients</b>
<b>Retrovirus</b>	Expressió estable	Infecta únicament cèl·lules en divisió
	Possibilitat de pseudotipar els vectors per modificar el tropisme	Integració aleatòria en el genoma de l'hoste. Risc de carcinogènesi
	Baixa/Nul·la immunogenicitat	Limitada capacitat per introduir ADN exogen (8Kb)
<b>Lentivirus</b>	Infecta tant cèl·lules en divisió com quiescents	Potencial patogenicitat dels vectors derivats del VHI (?)
	Expressió estable durant llargs períodes de temps	Integració aleatòria en el genoma de l'hoste
	Baixa/Nul·la immunogenicitat	Limitada capacitat per introduir ADN exogen (8Kb)
<b>Adenovirus</b>	Elevada eficiència de transducció	Relativament baixa producció de virus Expressió transitòria del transgen
	Infecta tant cèl·lules en divisió com quiescents	Elevada immunogenecitat (vectors de primera i segona generació)
	Gran capacitat de clonatge en Ad d'última generació (36 kb)	Difícil producció de virus (Ad d'última generació)
	Moderada/Baixa immunogenicitat en Ad d'última generació	Toxicitat aguda amb elevades dosi sistèmiques
	Elevada producció de virus (Ad de primera generació)	
<b>Virus adenoassociats</b>	Gran nombre de serotips amb varietat de tropisme	Poca capacitat d'incorporació d'ADN exogen (4.7 kb)
	Infecta tant cèl·lules en divisió com quiescents	Limitada efectivitat quan existeixen anticossos contra AAV
	No s'ha descrit patogenicitat	Reacció immunitària contra les proteïnes de la càpside del serotip 1 i 2 en humans
	Elevada producció de virus	
<b>ADN plasmídic</b>	Baixa/Nul·la immunogenicitat	Expressió transitòria
	Elevada bioseguretat	Dany transitori en el teixit transduït
	Absència de límits estrictes en la capacitat d'incorporació d'ADN	
	Possibilitat de múltiples administracions	

Taula 1. Avantatges i inconvenients dels principals vectors utilitzats per teràpia gènica.

### 5.3.2. Adenovirus

Els adenovirus han estat els vectors virals més utilitzats en teràpia gènica, van ser descrits i aïllats per primera vegada per Rowe l'any 1953 a partir d'adenoides humans en la recerca dels agents causals d'un refredat comú al reconèixer un agent transmissible que estava destruint les cèl·lules epitelials (ROWE et al., 1953).

Des d'aleshores dins de la família Adenoviridae s'han descrit més de 51 serotips d'adenovirus humans que es classifiquen en 6 grups (A-F) en funció de les seves característiques immunològiques, biològiques i les seves seqüències genòmiques. En general els adenovirus causen, en hostes immunocompatents, infeccions que cursen amb afeccions respiratòries, oculars i gastrointestinals lleus. Els adenovirus millor caracteritzats i més utilitzats en teràpia gènica són els Ad tipus 2 i 5, ambdós pertanyents al grup C.

Els primers estudis realitzats utilitzant els adenovirus com a vectors de transferència gènica es situen entre els anys 1991 i 1993 (Becker et al., 1994a; Becker et al., 1994b; Berkner, 1988). Els adenovirus recombinants o vectors adenovirics són virus deficients als que s'han deletat regions del genoma indispensables per a la seva replicació.

#### 5.3.2.1. Estructura dels adenovirus

La partícula de l'adenovirus o virió està composta per una càpside icosaèdrica sense embolcall lipídic d'entre 70-100 nm de diàmetre formada principalment per 8 proteïnes estructurals, de les quals les 3 majoritàries són els hexons, els pentons i les fibres (Fig. 10). Cada càpside està formada per 240 capsòmers hexagonals (formats per 720 monòmers d'hexons) que constitueixen les 20 cares del icosaèdre, 12 capsòmers pentagonals (formats per 60 monòmers de pentons) que componen els 12 vèrtex del icosaèdre des de cadascun dels quals es projecta a mode d'antena la proteïna de la fibra. Cada càpside conté 36 monòmers de fibres, i cada fibra està constituïda per tres dominis ben diferenciats: l'extrem N-terminal, responsable de la unió al pentó, la regió central o cos de la fibra, important en el procés infectiu, i l'extrem globular C-terminal anomenat domini knob, responsable de la interacció del virus amb el receptor CAR (receptor coxsackie-adenovirus) (Zhang and Bergelson, 2005).

Trobem altres proteïnes minoritàries de la càpside, com la proteïna IIIa que uneix la base dels pentons, els hexons i la proteïna de la fibra, o la proteïna VIII que actua estabilitzant les interaccions entre els hexons en la partícula de l'adenovirus) (Saban et al., 2005; San Martín et al., 2008) (Fig. 10).

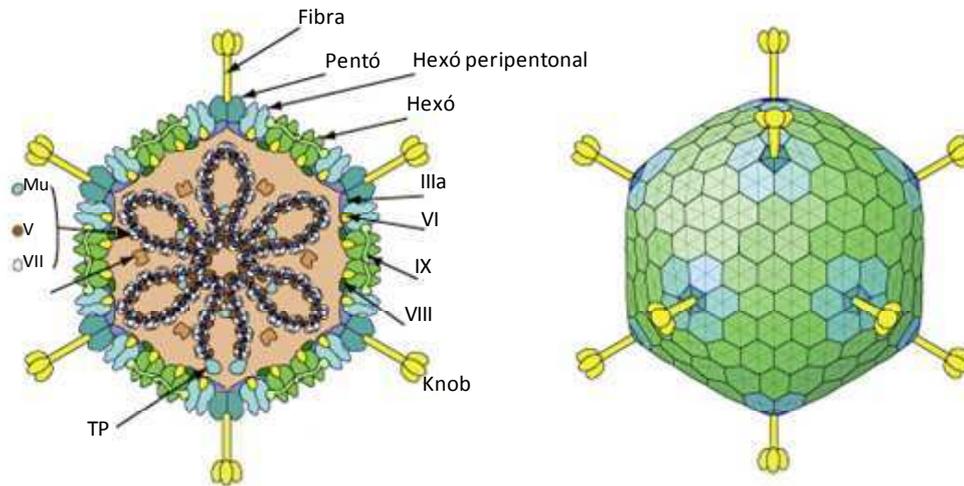


Figura 10. Il·lustració esquemàtica de l'estructura del virió d'adenovirus. Adabtat de: [ssg-adenovirus.blogspot.com](http://ssg-adenovirus.blogspot.com)

El genoma viral és lineal i està format per una doble cadena de DNA de 36-40 Kb, presenta cassets gènics (unitats transcripcionals) solapats en ambdues cadenes de DNA, i gràcies a l'empalmament (*splicing*) alternatiu, s'arriben a transcriure fins a 50 proteïnes diferents (Verma and Weitzman, 2005). L'anàlisi de les seqüències dels genomes de diferents adenovirus ha posat de manifest l'existència de diverses repeticions terminals invertides (ITRs) que varien en tamany de 36 fins a 200 parells de bases i que funcionen com a orígens de replicació (Davison et al., 2003). Les seqüències de DNA que codifiquen per la majoria de les proteïnes estructurals del virió, les proteïnes relacionades amb la replicació viral així com en l'assemblatge estan majoritàriament conservades en tots els genomes adenovírics. Pel contrari, les seqüències de DNA de les regions d'expressió primerenca 1, 2 i 4 així com la regió que codifica pel VA RNA (*small virus-associated RNA*) es troben en tots els virus aïllats en mamífers però no en altres gèneres de la família Adenoviridae (Davison et al., 2003), les proteïnes codificades per aquestes regions són les encarregades de regular diversos processos virals entre els que s'inclou la transcripció del genoma viral, el processament del RNA i la seva posterior exportació al nucli.

El genoma del adenovirus es troba associat a 5 proteïnes diferents: la proteïna terminal TP (671 aminoàcids), que es troba unida covalentment als extrems 5' terminals (Rekosh et al., 1977), la proteïna VII i el pèptid Mu (Anderson et al., 1989) que estan íntimament units al DNA, i el polipèptid V que també està empaquetat amb el genoma del virus i li confereix una unió estructural amb el polipèptid VI de la càpside (Matthews and Russell, 1995). El virus també conté 10 còpies de la cisteïna-proteasa viral p23 necessària pel processament d'algunes proteïnes estructurals i la producció de partícules víriques infeccioses madures (Russell, 2009)(Fig. 10).

#### 5.3.2.2. Infecció amb adenovirus

Els adenovirus són virus amb cicle lític. L'entrada del virus a la cèl·lula hoste té lloc mitjançant el reconeixement i la interacció d'alta afinitat que s'estableix entre el domini globular de la fibra i receptors situats en la membrana cel·lular.

El principal receptor per el subgrup C d'adenovirus és el receptor del virus Coxsackie B/Adenovirus (CAR). Es tracta d'una glicoproteïna transmembrana d'uns 46 KDa que pertany a la superfamília de les immunoglobulines, consta de dos dominis extracel·lulars (distal o D1 i proximal o D2), una regió hidrofòbica transmembrana i un domini citoplasmàtic. El domini D1 és suficient per a la interacció amb el domini globular de la fibra adenoviral (Freimuth et al., 1999). La presència del CAR condiciona la susceptibilitat a la infecció per adenovirus i la seva absència en la membrana de determinats tipus cel·lulars explica la resistència d'aquests a la infecció per adenovirus (Mentel et al., 1997). A part dels serotips 2 i 5 d'adenovirus, altres serotips d'adenovirus humans (Roelvink et al., 1998) així com adenovirus no humans, poden interaccionar amb CAR, en canvi adenovirus d'altres espècies sembla que entren a la cèl·lula de manera independent a CAR (Bangari and Mittal, 2005). També s'han descrit proteïnes amb un alt grau d'homologia amb el CAR humà en gran varietat d'espècies (Bergelson et al., 1997; Fechner et al., 1999). D'altra banda, existeixen altres receptors com el CD46 que és el receptor per la majoria dels adenovirus humans del grup B (Pache et al., 2008; Persson et al., 2007), s'ha determinat que vectors de teràpia gènica derivats d'adenovirus del grup B o vectors quimèrics amb fibres del grup B poden transfectar de manera eficient tipus cel·lulars que són refractaris als vectors tradicionals derivats dels adenovirus 5, incloent cèl·lules cancerígenes, cèl·lules

mare hematopoètiques i limfòcits. Alguns membres del grup D utilitzen l'àcid siàlic com a receptor cel·lular (Arnberg et al., 2002; Arnberg et al., 2000). També s'han identificat proteïnes de membrana com CD80 i CD86, que pertanyen a la superfamília de les immunoglobulines, i els proteoglicans com a receptors primaris per adenovirus. Per últim, múltiples tipus d'integrines són capaces d'actuar com a receptors secundaris d'adenovirus a través dels motius RGD i LDV situats en els bucles exposats del pentó.

Seguidament al reconeixement i la interacció amb el receptor es dona la internalització de la partícula vírica, via endocitosis mediada per clatrina. S'ha determinat que es dona una interacció secundària entre el motiu RGD (Arg-Gly-Asp) del pentó i les integrines  $\alpha v$  (Wickham et al., 1993) i és aquesta unió pentó-integrina que permet la internalització del virus mitjançant la formació de vesícules de clatrina (Stewart et al., 1997). Durant el transport cap al nucli es produeix un desensamblatge parcial de la partícula vírica en que les proteïnes dels vèrtex del icosaèdre són alliberades al medi àcid de l'interior de l'endosoma. L'alliberació de la proteïna VI provoca la lisi de la membrana endosomal (Wiethoff et al., 2005), permetent que la subpartícula vírica formada en l'endosoma sigui alliberada al citoplasma. Un cop al citoplasma, la subpartícula s'associa a la dineïna, proteïna motriu, que la transporta a través dels microtúbuls del citoesquelet fins al nucli (Suomalainen et al., 1999). El procés d'entrada culmina amb l'alliberació de l'àcid nucleic viral i el seu trànsit a través del complex del porus nuclear fins assolir el nucli cel·lular, una vegada dins el nucli el virus aprofitarà la maquinària transcripcional cel·lular per iniciar la transcripció dels gens virals.

La transcripció del genoma viral es dona en dues fases: la primerenca (early) en que es transcriuen els gens primerencs (E1, E2, E3 i E4) i la tardana (late) en que es transcriuen els gens tardans (L1, L2, L3, L4 i L5).

Durant la fase primerenca, la cèl·lula hoste es converteix en una productora eficient del genoma viral. Degut a que la gran majoria de les cèl·lules hoste es troben en estat quiescent en el moment de la infecció, les proteïnes virals han d'interaccionar amb les proteïnes de la cèl·lula hoste per tal d'activar la replicació i la divisió cel·lular, al mateix temps que protegir la cèl·lula infectada d'atacs immunològics i d'activacions de cascades proapoptòtiques.

La transcripció, replicació i encapsidació del genoma de l'adenovirus tenen lloc en el nucli de la cèl·lula infectada i s'inicien amb la transcripció dels gens primerencs. Els productes de E1 es

divideixen en E1A i E1B. El primer gen que es transcriu a nivell del genoma viral és E1A, donant lloc a dues proteïnes, 289R i 243R, les quals estan involucrades en la regulació de la transcripció i la replicació viral. La funció principal d'aquestes proteïnes és modular el metabolisme cel·lular per fer a la cèl·lula susceptible de la replicació viral (Russell, 2009). La desregulació del cicle cel·lular provocada per E1A indueix l'acumulació del gen supressor de tumors p53, l'activació de la via p53 portaria a la inducció de l'apoptosi però l'expressió del gen adenoviral E1B impedeix la mort prematura de la cèl·lula hoste. E1B genera mitjançant processos de splicing alternatiu dues proteïnes, 19k i 55k, necessàries per bloquejar el transport del RNAm cel·lular i estimular el del RNAm adenoviral, afavorir la replicació viral i bloquejar la inducció de l'apoptosi (dependent principalment de p53), la proteïna E1B-55kD s'uneix a p53 i indueix la seva degradació, mentre que la proteïna E1B-19kD presenta funcions similars al factor antiapoptòtic Bcl2. A través d'aquests mecanismes el virus manté a la cèl·lula viva el màxim de temps possible per tal de maximitzar la producció viral (Russell, 2009).

La regió E2 codifica per la maquinaria replicativa del DNA del virus, E2 es divideix en 2 subregions E2a i E2b que comparteixen el mateix promotor, E2a codifica per la proteïna d'unió al DNA (DBP) i E2b per la polimerasa viral (Pol) i el precursor de la proteïna terminal (pTP)(Caravokyri and Leppard, 1996; Hay et al., 1995).

E3 dóna lloc a nombroses proteïnes involucrades principalment en l'evasió de la resposta immunitària de l'hoste generada contra l' adenovirus (Wold and Gooding, 1991) i en facilitar la lisis cel·lular per tal d'alliberar els nous virions formats (Tollefson et al., 1996). La proteïna gp19k s'uneix a la cadena pesada del MHC-I i la reté en el reticle endoplasmàtic evitant la seva translocació a la membrana plasmàtica i així eludir el reconeixement per part dels limfòcits (Bennett et al., 1999). E3 també codifica per una proteïna anomenada *adenovirus death* (ADP) necessària per l'alliberació eficient dels virions del nucli i la lisi de la cèl·lula (Tollefson et al., 1996).

E4 codifica per al menys 7 proteïnes (ORF 1-6/7) que faciliten el metabolisme del RNAm viral, promouen la replicació del DNA viral, l'expressió dels gens tardans i el *shut off* de la síntesi de proteïnes cel·lulars. Els productes dels ORF 3 i 6 faciliten el creixement viral incrementant l'estabilitat dels transcrits tardans en el nucli, a més la proteïna ORF6 forma complexes amb la proteïna E1B per promoure el transport dels RNAs virals a l'exterior del nucli. El producte dels

ORF 6/7 s'uneix al factor de transcripció cel·lular E2F activant la regió E2 per augmentar l'expressió de proteïnes implicades en la replicació viral.

La replicació del DNA viral comença 8 hores després de la infecció, s'inicia en ambdós extrems del genoma viral utilitzant els ITRs i la TP com a motllo per la síntesi de DNA catalitzada per la polimerasa adenoviral (Pol). La síntesi continua al llarg del genoma mitjançant un mecanisme de desplaçament que requereix diferents proteïnes d'unió al DNA, Pol i factors cel·lulars (Hay et al., 1995).

Després de la replicació comença la fase de transcripció tardana. En aquest moment quasi la totalitat de les proteïnes expressades són d'origen viral degut bàsicament a l'activitat dels productes de E1 i E4. La transcripció tardana està controlada pel promotor MLP (Major Late Promoter) i dóna lloc a 5 transcrits (L1-L5) per processos de *splicing*. L1-L5 codifiquen per les proteïnes estructurals, les proteïnes necessàries per l'encapsidació del genoma viral i per la maduració dels virions. En aquesta fase tardana es transcriuen els VA RNAs que no es tradueixen, necessaris per la traducció dels transcrits virals tardans i per la inhibició de les proteïnes antivirals induïdes per l'interferó (Russell, 2000). També s'expressa la proteïna IX que contribueix a l'estabilitat tèrmica de l'adenovirus i a l'eficiència de l'encapsidació del genoma viral. El procés d'encapsidació està dirigit per la presència en el genoma viral del senyal d'empaquetament que consisteix en diverses seqüències riques en A-T (Hearing et al., 1987). La producció de virions continua durant 40 hores i s'acompanya de canvis importants en l'estructura i permeabilitat nuclear, facilitant la sortida del virus al citoplasma i finalitzant amb la lisi cel·lular i l'alliberació de les partícules virals (Tollefson et al., 1996).

### 5.3.2.3. Adenovirus com a vectors d'expressió

Els adenovirus presenten una sèrie de característiques que els converteixen en bons vectors per a la teràpia gènica: tenen una elevada bioseguretat i són produïts fàcilment en concentracions elevades (per sobre de  $10^{13}$  partícules/ml), infecten eficaçment un gran nombre de tipus cel·lulars, tant si es troben en divisió com si estan en estat de quiescència, presenten una alta eficiència de transfecció i per tant expressen elevades quantitats del transgen, el material genètic transferit resta episomal (fora del propi genoma) per la qual cosa desapareix el risc de mutagènesi per integració del DNA viral al de la cèl·lula hoste. Tanmateix, la divisió

cel·lular va diluint el nombre de partícules adenovirals fins a desaparèixer. Però, el principal inconvenient dels adenovirus de primera generació com a vectors de transferència gènica *in vivo* és la resposta immunològica que generen. Les cèl·lules transfectades amb adenovirus donen lloc a una resposta immune inflamatòria, que portarà a la destrucció de les cèl·lules modificades, limitant la duració de l'expressió del transgèn a un període que pot anar d'algunes setmanes a pocs mesos. Aquest fet s'explica per l'expressió de proteïnes víriques altament immunogèniques.

Els adenovirus que s'utilitzen com a vectors d'expressió són virus delecionats, els adenovirus recombinants de primera generació tenen delecionades les regions E1 i/o E3 (Fig. 11), la delecio té una doble finalitat, d'una banda converteix als adenovirus en vectors incapaçs de replicar-se i de l'altra proporciona cabuda al gen forà, els vectors adenovirals de primera generació delecionats en E1 permeten incorporar DNA extern de fins a 5,1 Kb i els delecionats en E1 i E3 de fins a 8,2 Kb. El fet que les proteïnes expressades en la regió E1 siguin imprescindibles per la replicació dels adenovirus i per l'expressió d'altres gens virals, com són els de la regió E2, fa que la producció d'aquests adenovirus recombinants s'hagi de realitzar en cèl·lules transformades que proveeixin les proteïnes codificades per la regió E1 en *trans*, essent la línia cel·lular 293 la més utilitzada (Graham et al., 1977). La regió E3 codifica per proteïnes que contraresten els mecanismes de defensa de la cèl·lula hoste, aquestes proteïnes no són imprescindibles per a la replicació viral pel que no és necessari que la línia cel·lular les aporti. Malgrat els vectors tinguin delecionada la regió E1 i no puguin replicar-se, l'expressió residual de gens adenovirals pot desencadenar la resposta immune dels limfòcits T citotòxics (Yang et al., 1994) portant a l'eliminació de les cèl·lules transduïdes i per tant, a la pèrdua de l'expressió gènica del gen exogen.

Per evitar aquest problema es van generar els adenovirus de segona generació en els quals es van deleccionar a més de les regions primerenques E1 i/o E3 també les regions E2 i/o E4 ja que es va determinar que al utilitzar títols molt elevats de virus de primera generació la regió E2 podia expressar-se tot i que la regió E1 s'hagués eliminat, generant-se adenovirus replicatius (RCA; Replicative-Competent Adenovirus) i provocant la mort de les cèl·lules hoste de manera agreujada pel fet que no es dónes la inhibició de l'apoptosi en front de la infecció degut a d'inexistència de les proteïnes E1. L'eliminació de les regions E2 i/o E4 permet incorporar fins a 14 kD de DNA exogen. Ara bé, amb els adenovirus de segona generació no s'elimina l'immunogenicitat i per la seva producció és requereixen línies cel·lulars complementaries més

sofisticades (Danthinne and Imperiale, 2000), a més no permeten obtenir títols virals tan elevats com en el cas dels vectors de primera generació (Volpers and Kochanek, 2004).

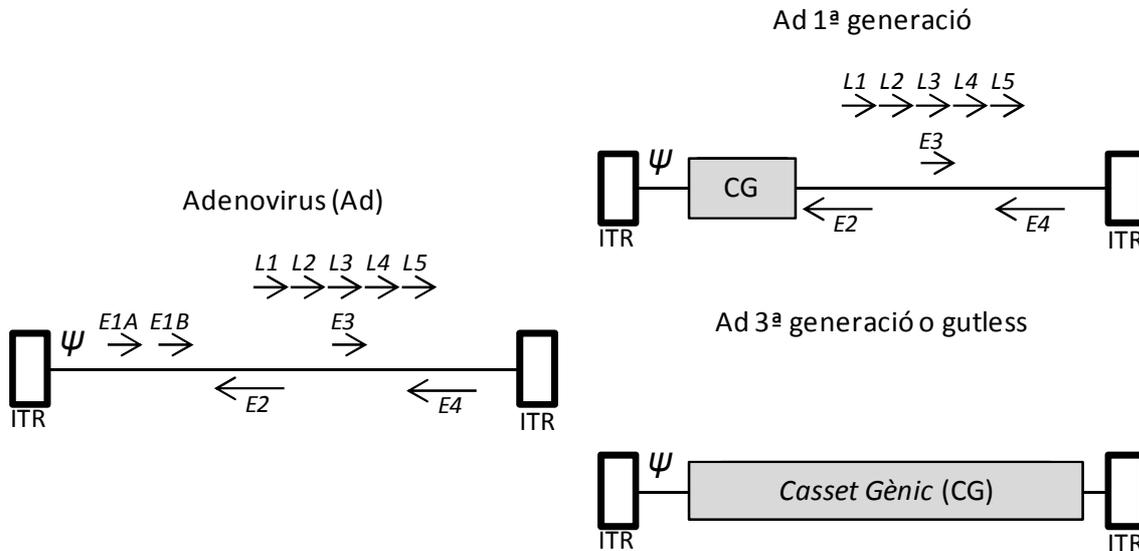


Figura 11. Esquema de l'organització del genoma en els Ad i en els seus vectors. El genoma dels Ad té un conjunt de gens early (E) i gens late (L), un senyal d'empaquetat ( $\psi$ ) i les ITR (Inverted Terminal Repeats). Els vectors adenovirals de 1ª generació substitueixen els gens E1A i E1B i/o E3 pel casset gènic (CG) i es mantenen la resta de gens virals,  $\psi$  i ITR. Els vectors gutless no contenen cap gen viral i només contenen  $\psi$  i ITR.

Els adenovirus de tercera generació també anomenats “gutless” o “helper-dependent” adenovirus (Amalfitano et al., 1998) són vectors adenovirals als quals s’han eliminat tots els gens virals i només conserven intactes les seqüències que actuen en *cis*, és a dir, les regions ITRs i la seqüència d’empaquetament (Fig. 11). Aquests virus permeten incorporar fins a 36 kD de DNA exogen. Per a la seva propagació, els adenovirus gutless, necessiten cèl·lules complementàries i un virus helper que porti totes les regions codificants del virus que actuaran en *trans*. L’obtenció de virus gutless lliures de contaminació per partícules helper requereix una meticulosa i costosa purificació, és difícil produir títols alts de virus i el seu genoma és sovint inestable. Per l’eliminació de la contaminació de les partícules helper de la preparació final s’han generat diferents sistemes basats en l’escissió del senyal d’empaquetament del helper, entre ells el més usat és el sistema Cre-loxP (Parks et al., 1996), però se’n han desenvolupat d’altres com són la deleció de la proteïna IX del helper. pIX és una proteïna associada a l’hexó essencial per l’empaquetament dels genomes virals, o bé l’ús de

vectors no adenovirics com a helpers, com són el virus de l'Herpes Simplex (Kubo et al., 2003) i el Baculovirus (Cheshenko et al., 2001). Els vectors gutless es consideren els vectors adenovirals més segurs degut a que la manca de les proteïnes virals fa que generin una resposta immune innata molt limitada, ara bé, la seva producció és un procés complicat, sobretot l'eliminació del virus helper, i la seva eficiència és controvertida i sembla que pot dependre del teixit que s'ha de tractar, de l'origen exacte del vector, de l'hoste i del tipus de transgen.

#### 5.3.2.4. Adenovirus i l'illot pancreàtic

Tot i que per transfectar els illots pancreàtics han estat utilitzats diversos vectors d'expressió, entre els quals trobem DNA plasmídic (Gainer et al., 1998), lisosomes catiónics (Benhamou et al., 1997; Welsh et al., 1990), dominis de fusió de pèptids (Embury et al., 2001; Mi et al., 2000; Rehman et al., 2003), virus adenoassociats (Flotte et al., 2001; Kapturczak et al., 2002; Yang and Kotin, 2000), lentivirus (Gallichan et al., 1998; Giannoukakis et al., 1999a; Ju et al., 1998), retrovirus (Leibowitz et al., 1999), Herpes Simplex Virus (Liu et al., 1996; Rabinovitch et al., 1999), són els vectors adenovirals els que han estat més àmpliament usats per la introducció de gens exògens a les cèl·lules de l'illot pancreàtic (Becker et al., 1994a; Contreras et al., 2001; Giannoukakis et al., 1999b; Moriscot et al., 2000; Téllez et al., 2005; Téllez et al., 2007; von Herrath et al., 1997).

Els adenovirus són bons vectors d'expressió per la transferència *ex vivo* de gens a les cèl·lules de l'illot pancreàtic, oferint un vehicle adequat tant per la prevenció de la mort cel·lular beta mitjançant l'expressió de gens immunoreguladors, citoprotectors o antiapoptòtics (Fernandes et al., 2004; Tran et al., 2004; Téllez et al., 2007), com per l'estimulació de la diferenciació i la regeneració de les cèl·lules beta a través de la inducció de reguladors de la transcripció i factors de creixement (Brun et al., 2004; Cozar-Castellano et al., 2004).

És de remarcar també, que, aquests vectors han demostrat assolir una bona eficiència de la infecció de les cèl·lules de l'illot, és a dir del percentatge de cèl·lules de l'illot que expressen el transgen, tot i que la infecció es localitzi principalment en les cèl·lules de la perifèria de l'illot.

Malgrat que la utilització d'elevades quantitats de virus pot tenir efectes deleteris en les cèl·lules de l'illot (Barbu et al., 2005), s'ha descrit que la infecció amb adenovirus a baixes MOI no afecta ni la viabilitat ni la funció dels illots (Weber et al., 1997).

D'altra banda, tot i que l'expressió del transgen introduït mitjançant un vector adenoviral sigui transitòria, s'ha determinat que l'expressió d'un gen marcador ( $\beta$ -galactosidasa) es pot detectar en illots infectats *ex vivo* i posteriorment trasplantats fins un mínim de 140 dies post-trasplantament (Muruve et al., 1997).

Per últim, cal mencionar que els adenovirus són, al marge dels seus potencials usos terapèutics, valuoses eines experimentals per la manipulació genètica de les cèl·lules de l'illot.

### 5.3.3. Teràpia gènica en diabetis

La teràpia gènica es una eina prometedora pel tractament de moltes malalties humanes, incloent la diabetis (Yechool and Chan, 2005). En els últims anys la teràpia gènica pel tractament de la diabetis ha estat abordada des de diverses perspectives, utilitzant gran varietat de vectors d'expressió i de manipulacions genètiques per tal d'aconseguir el manteniment o la normalització dels nivells de glucosa en sang. Entre les diverses estratègies utilitzades són de destacar:

*Teràpia gènica ex vivo.* Aquesta teràpia es basa en la modificació genètica dels illots per tal de, per exemple, conferir-los resistència contra el sistema immunitari, millorar la seva supervivència o augmentar-ne la proliferació per la seva posterior reintroducció a l'organisme, mitjançant el trasplantament d'illots pancreàtics. En aquest sentit s'han portat a terme un elevat número d'estudis centrats en la teràpia gènica dirigits a la transferència de gens antiapoptòtics, proangiogènics o immunomoduladors, entre d'altres, mitjançant l'ús de vectors virals i no virals.

*Teràpia gènica preventiva.* S'han descrit un gran número d'aproximacions en models animals que tenen com objectiu reduir o eliminar la resposta immunitària contra la cèl·lula beta. Malgrat això, en l'actualitat és difícil que aquestes aproximacions es puguin traslladar a la clínica degut a la manca de marcadors 100% fiables per poder predir quins individus desenvoluparan diabetis tipus 1. Per desenvolupar aquest tipus d'aproximació, doncs, es requereixen tècniques avançades capaces d'identificar la susceptibilitat genètica individual al risc de desenvolupar diabetis, com són les anàlisis de lligament de genoma complet amb les quals s'han relacionat determinats haplotips del locus de l'antigen leucocitari humà (HLA) i la

predisposició a patir diabetis tipus 1 (Golden et al., 2005). Ara bé, en els casos en que la patologia no es pot identificar de manera primerenca i es desenvolupa, la manipulació genètica permet la realització de diverses tècniques que poden ser usades com a mesures de protecció pels illots trasplantats, tècniques com són la inducció de la tolerància immune (Ansari et al., 2003; Giannoukakis et al., 1999c), la interferència en la presentació d'antigen (Arnush et al., 1998a; Arnush et al., 1998b; Corbett and McDaniel, 1995; McDaniel et al., 1996; Stassi et al., 1997), la interferència amb l'activació o la co-estimulació de les cèl·lules T (Giannoukakis et al., 1999c), la immune regulació de les citocines (Bregenholt et al., 2003; Cameron et al., 2000; Creusot et al., 2008; Dénes et al., 2006; Meagher et al., 2007; Sadeghi et al., 2002; Sun et al., 1994) i la inhibició de l'apoptosi (Giannoukakis et al., 2000; Grey et al., 1999; Klein et al., 2000; Kojima et al., 2009)

*Teràpia gènica curativa.* Aquesta estratègia té com a finalitat la regeneració de la massa beta *in situ* en el pàncrees del pacient i a la vegada reduir la resposta immunitària. L'objectiu es incrementar la replicació de les cèl·lules beta remanents o bé induir la formació de noves cèl·lules beta, per tal de regenerar els illots destruïts i protegir les noves cèl·lules beta del atac autoimmune. Malgrat el pàncrees és un òrgan difícil de manipular, ja que fàcilment es pot induir pancreatitis, amb l'ús d'eines de transferència gènica és possible expressar factors involucrats en la diferenciació, manteniment i funció de les cèl·lules beta directament al pàncrees. Alguns exemples són la protecció de l'atac autoimmune de les cèl·lules beta en ratolins NOD mitjançant l'expressió de IL-4 utilitzant vectors AAV. L'increment de la replicació beta per sobreexpressió de GLP-1 mitjançant virus adenoassociats, o l'estimulació de la neogènesi beta gràcies a l'expressió d'una combinació de factors de transcripció importants pel procés de diferenciació beta, en aquest sentit la transferència dels gens Pdx-1, Ngn-3 i MafaA ha permès aconseguir la formació de cèl·lules productores de insulina a partir de cèl·lules exocrines. Aquestes aproximacions indiquen que a través de la combinació de gens terapèutics clau, vectors de transfecció més eficients i vies d'administració més específiques en el futur la regeneració del pàncrees podria esdevenir una realitat.

*Teràpia gènica substitutiva.* Diverses aproximacions tenen l'objectiu de mantenir la normoglicèmia contrarestant la hiperglicèmia diabètica a través l'increment de la captació de glucosa per part dels teixits perifèrics gràcies a l'expressió del gen de la insulina en teixits extrapancreàtics. Com que la diabetis tipus 1 és una malaltia autoimmunitària que afecta

selectivament les cèl·lules beta pancreàtiques productores d'insulina, alguns tractaments de teràpia gènica intenten recrear les funcions de les cèl·lules beta en altres tipus cel·lulars de l'organisme evitant d'aquesta manera l'atac del sistema immunitari. Entre els tipus cel·lulars que s'han manipulat genèticament per aconseguir cèl·lules productores d'insulina trobem el múscul esquelètic, les cèl·lules epitelials, com els queratinòcits, que s'han transfectat mitjançant vectors virals per convertir-los en productors d'insulina (Lei et al., 2007; Soltani et al., 2007; Tian et al., 2008), experiments similars s'han realitzat amb les cèl·lules k enteroendocrines (Zhang et al., 2008). Nombrosos grups de recerca han utilitzat els hepatòcits com a cèl·lules diana per aconseguir cèl·lules amb la capacitat de fabricar insulina, ja sigui mitjançant la introducció del propi gen de la insulina, o bé inserint altres gens per promoure la seva expressió (Fodor et al., 2007; Hsu et al., 2008; Koizumi et al., 2006; Olson et al., 2008; Ren et al., 2007) o l'administració de PDX-1 usant adenovirus per adreçar la funció dels hepatòcits a cèl·lules productores d'insulina (Shternhall-Ron et al., 2007). D'altra banda, estudis realitzats amb cèl·lules mare mesènquimals murines transfectades amb el gen de la insulina han assolit bons nivells d'expressió del transgen i han mantingut la normoglicèmia de ratolins diabètics amb èxit (Xu et al., 2007). Altres aproximacions experimentals utilitzades per redirigir la funcionalitat de determinats tipus cel·lulars utilitzant vectors d'expressió són per exemple l'ús de mètodes no virals com les nanopartícules per transfectar el gen de la insulina a través del tracte gastrointestinal (Niu et al., 2008), o altres tècniques no virals com l'electroporació mitjançant la qual Soltani et al. van induir l'expressió de GLP-1 a les fibres musculars de ratolins diabètics per STZ aconseguint una disminució de la incidència de la diabetis del 50% (Soltani et al., 2007).

*Teràpia gènica per les complicacions secundàries.* Aquesta teràpia té la finalitat de contrarestar o endarrerir la retinopatia, la nefropatia o la neuropatia diabètiques. Aquestes aproximacions representen una àrea d'investigació activa i, malgrat la majoria d'estudis són experimentals, existeix algun assaig clínic de teràpia gènica per la isquèmia de les extremitats en pacients diabètics.

En definitiva, els avenços assolits els darrers anys en la teràpia gènica en diabetis indiquen que es treballa en la direcció correcta però queden, encara, molts aspectes que cal optimitzar en aquest camp.

## 6. ELS FACTORS DE CREIXEMENT SIMILARS A LA INSULINA (IGFs).

### 6.1. Antecedents històrics

Els factors de creixement similars a la insulina (IGFs) es van descobrir en base a la seva capacitat d'estimular la sulfatació del cartílag i substituir l'activitat com a factor de sulfatació de l'hormona del creixement (SALMON and DAUGHADAY, 1957). La seva significació biològica, però, va augmentar ràpidament en identificar-se la seva acció sobre l'estimulació de la síntesi de DNA (Daughaday and Reeder, 1966), la síntesi de proteoglicans (Hall and Uthne, 1971), la síntesi de glicosaminoglicans (Daughaday et al., 1975) i la síntesi proteica (Salmon and DuVall, 1970). En reconeixement als seus efectes pleiotròpics, a principis dels anys 70 el factor de sulfatació va ser reanomenat somatomedina (mitjancer dels efectes de la somatotropina) i es va incloure en la classificació emergent dels factors de creixement conjuntament amb el factor de creixement derivat de les plaquetes, el factor de creixement de fibroblasts i el factor de creixement epidèrmic (Daughaday et al., 1972).

Durant el període en que es van començar a caracteritzar les accions biològiques del factor de sulfatació, estudis paral·lels intentaven definir factors en sèrum amb la capacitat d'estimular efectes tipus insulina.

Ja en el 1941, Gellhorn i col·laboradors van determinar que l'administració de sang humana a rates hipofisectomitzades i adrenalectomitzades provocava una caiguda dels nivells de glucosa en sang. Aquesta va ser una de les primeres demostracions que la sang humana posseïa la capacitat de disminuir la glucosa, o el que és el mateix, tenia activitat tipus insulina (ILA, de l'anglès insulin-like activity). Gellhorn va assumir que havia detectat només insulina. Durant la dècada dels 60, però, es va fer evident que el plasma amb ILA contenia almenys dos components: un ILA suprimible (SILA), on l'ILA s'inactivava per anticossos anti-insulina i era considerat, per tant, indistingible de la insulina pancreàtica, i l'altre ILA no suprimible (NSILA), on l'ILA no es veia afectada per anticossos anti-insulina (FROESCH et al., 1963).

Treballs posteriors van resoldre que la NSILA es dividia en dos components, es va establir la seva identitat amb les somatomedines i la seva similitud amb la proinsulina i la insulina. Va ser en el 1976 quan Rinderknecht i Humbel, que prèviament havien identificat dos polipèptids amb activitats promotores del creixement, van recomanar la designació de factor de creixement similar a la insulina (IGF, de l'anglès insulin-like growth factor) per substituir la de NSILA i

d'aquesta manera emfatitzar les seves accions predominantment mitogèniques (Rinderknecht and Humbel, 1976a, b). NSILA I va esdevenir IGF1, i NSILA II IGF2, el 1978 els mateixos autors van publicar les seqüències aminoacídiques completes d'ambdós pèptids: IGF1 (Rinderknecht and Humbel, 1978b) i IGF2 (Rinderknecht and Humbel, 1978a). És de remarcar que la insulina i els IGF presenten sorprenents homologies en la composició d'aminoàcids i un cert grau de solapament en les seves vies de senyalització i les seves accions.

Les proteïnes "insulin-like" han estat identificades no només en totes les classes de vertebrats, sinó també en els mol·luscs, insectes i nematodes. Aquestes observacions són la base per hipotetitzar que els gens que codifiquen per les insulines i els IGFs de vertebrats i les molècules tipus insulina d'invertebrats han evolucionat a partir d'un gen ancestral comú, i per tant, es reforça el concepte d'una superfamília de pèptids de la insulina que promouen el creixement.

## **6.2. Elements del sistema IGF/Insulina**

Els factors de creixement similars a la insulina i la insulina i constitueixen una complexa xarxa que controla molts aspectes del metabolisme, el creixement i la supervivència en una àmplia gamma de teixits en mamífers (Nakae et al., 2001). La senyalització IGF/insulina també contribueix a la regulació de la durada de la vida (Narasimhan et al., 2009), el manteniment de l'homeòstasi tissular, l'angiogènesi, l'adhesió cel·lular, la migració, la cicatrització de ferides (LeRoith and Roberts, 2003) i té diversos efectes en el cervell (Broughton and Partridge, 2009), mentre que la seva desregulació ha estat implicada en la neoplàsia i altres patologies (Pollak, 2008). És per això que l'estudi dels IGFs inclou d'una banda, el potencial terapèutic, i de l'altra, el paper en la patogènesi tant en les malalties neoplàsiques com en d'altres patologies humanes.

El sistema IGF/insulina està format pels factors de creixement IGF1 i IGF2 i la insulina, els seus respectius receptors de superfície: el receptor d'IGF1 (IGF1R), el receptor d'IGF2 (IGF2/manosa-6 fosfat R), el receptor de la insulina (IR), el receptor relacionat amb l'IR (IRR), més els receptors híbrids formats per hemireceptors del receptor de l'IGF1 i de la insulina (IGFR1R/IR), sis proteïnes d'unió específiques d'alta afinitat (IGFBP 1-6) i diverses proteïnes d'unió de baixa afinitat, conegudes com a proteïnes relacionades amb les IGFBP (IGFBP-rPs), proteïnes amb activitat proteasa, així com altres molècules que interactuen amb les IGFBP (Jones and

Clemmons, 1995; LeRoith et al., 1995; Nissley and Lopaczynski, 1991) (Fig. 12). Aquest complex sistema s'encarrega de propagar i regular les accions dels IGF en diversos teixits.

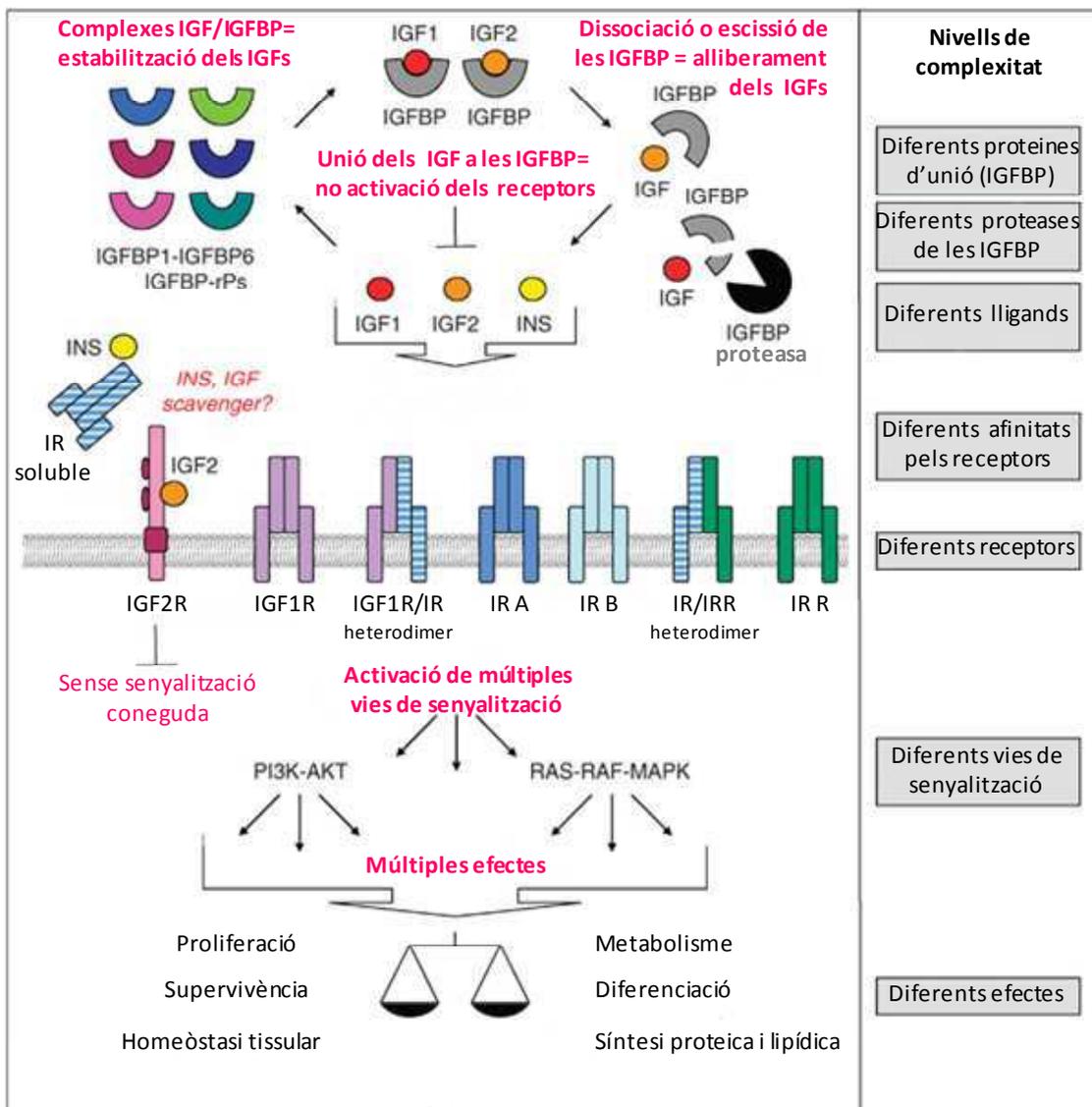


Figura 12. Esquema del sistema IGF/insulina. Es representen els diversos components que el formen, així com els diferents nivells de complexitat i els múltiples efectes que desencadena. Modificat de (Naftanel and Harlan, 2004).

### 6.2.1. Els factors de creixement similars a la insulina: IGF1 i IGF2

Els IGFs es sintetitzen principalment al fetge, però també es produeixen localment en molts altres teixits, on poden actuar de forma autocrina o paracrina (LeRoith and Roberts, 1993).

Tant l'IGF1 com l'IGF2 són polipèptids de cadena simple estructuralment homòlegs a la proinsulina. Estan constituïts per quatre dominis (A, B, C i D), on com en la proinsulina, el domini C és un pèptid de connexió que uneix l'extrem C-terminal de la cadena B amb l'extrem N-terminal de la cadena A, però a diferència d'aquesta, en el seu extrem carboxiterminal, a continuació del domini A, presenten una extensió: el domini D, que no és present en la proinsulina.

L'estructura terciària d'IGF1 i IGF2 es manté gràcies a tres ponts disulfur intracatenaris, dos entre les cadenes A i B i un tercer dins de la cadena A, que donen a la molècula la característica forma de bucle similar a la formada per la proinsulina.

Els models tridimensionals de la insulina, la proinsulina, i l'IGF1 mostren importants homologies estructurals, però també algunes diferències: El pèptid de connexió, o domini C, és molt més curt en l'IGF1 (12 residus) que en la proinsulina humana (35 residus). L'IGF1 no presenta parells de residus d'aminoàcids bàsics (Arg-Arg i Lys Arg-) que si es troben a cada extrem del domini C de la proinsulina (necessaris per l'escissió final del domini C), i per últim, la presència dels dominis D units a l'extrem C-terminal de la cadena A en els IGFs, dominis que no es troben en la proinsulina.

Els IGFs, a diferència de la insulina que circula a concentracions d'ordre picomolar, circulen a concentracions d'ordre de nanomolar, predominantment com a components de complexes heterotrimèrics que comprenen una molècula d'IGF1 o IGF2, la subunitat àcid-làbil (ALS) i una de les proteïnes d'unió IGFBP-3 o IGFBP-5, sent els complexes ternaris que contenen IGFBP-3 els que transporten el gruix dels IGFs en sèrum (Firth and Baxter, 2002). Quan els IGFs estan formant complexes, la seva vida mitja augmenta de minuts a hores, i el seu accés als receptors està restringit (Payet et al., 2004). El mecanisme pel qual els IGFs són alliberats d'aquests complexes relativament inerts per permetre el seu pas des de la circulació fins als seus teixits diana, no és encara conegut. La limitada proteòlisi de les IGFBPs pot reduir la seva afinitat pels IGFs (Binoux et al., 1993; Payet et al., 2004; Yan et al., 2009), així com la interacció amb la

matriu extracel·lular o la membrana plasmàtica, facilitant l'alliberament dels IGFs des dels complexos circulants.

#### 6.2.1.1. Factor de creixement similar a la insulina 1 (IGF1)

L'IGF1 és un polipèptid monocadena compost de 70 aminoàcids i amb un pes molecular de 7649 Da (Rinderknecht and Humbel, 1978b), codificat pel gen *Igf1* que es localitza en humans en el locus 12q22-24.

Els residus 1 al 29 de l'extrem N-terminal de la molècula d'IGF1 presenten una elevada homologia amb els residus 2 a 30 de la cadena B de la insulina, i els aminoàcids 42 a 62 presenten també una identitat del 52% amb els residus 1 a 21 d'aquesta hormona. Pel contrari no existeix cap analogia entre el pèptid de connexió (pèptid C) de la proinsulina i la part corresponent d'IGF1.

Les posicions dels tres enllaços disulfur i de les sis cisteïnes que els formen són també característiques estructurals conservades entre la insulina i l'IGF1, es mantenen també els residus d'aminoàcids hidrofòbics que formen els nuclis dels monòmers i son essencials per al manteniment de les seves configuracions tridimensionals. En contrast, els aminoàcids en la superfície de la insulina estan en la seva major part substituïts per altres residus en l'IGF1, fet que, molt probablement, explica el fracàs dels anticossos anti-insulina per reaccionar amb l'IGF1.

#### 6.2.1.2. Factor de creixement similar a la insulina 2 (IGF2)

L'IGF2 és un polipèptid de cadena simple compost de 67 aminoàcids i amb un pes molecular de 7471 Da (Rinderknecht and Humbel, 1978a) que presenta un elevat grau d'homologia amb l'IGF1 i la insulina. L'IGF2 està codificat pel gen *Igf2* que es localitza en humans en el locus 11p15.5.

L'expressió del gen que codifica per l'IGF2 està regulada per imprompta genòmica. La imprompta genòmica o imprinting genòmic és un mecanisme epigenètic de regulació

transcripcional que afecta un grup reduït de gens en mamífers i que resulta en l'expressió monoal·lèlica diferenciada d'aquests gens. L'al·lel expressat està determinat per l'origen parental. En el gen *Igf2* s'expressa exclusivament l'al·lel patern.

La majoria dels gens que presenten imprompta genòmica estan relacionats amb el desenvolupament embrionari, i l'expressió parental específica pot donar-se en totes les cèl·lules, en teixits específics o durant diferents etapes del desenvolupament, gràcies a l'existència de marques epigenètiques en determinats locus basades en l'origen de l'al·lel (matern o patern).

Les principals modificacions epigenètiques que determinen l'expressió parental específica en els gens que presenten imprompta genòmica són variacions en la metilació del DNA en els diferents al·lells, així com modificacions de la cua d'histones que alteren la conformació de la fibra de cromatina i, per tant, regulen l'expressió gènica. Les delecions, duplicacions, mutacions o alteracions de la imprompta de l'al·lel actiu, així com la pèrdua de la imprompta de l'al·lel inactiu, porten al desequilibri (pèrdua de funció o guany de funció) en la dosi del producte gènica i a importants conseqüències fenotípiques. Les alteracions genètiques o epigenètiques del gen *Igf2* estan implicades en la fisiopatologia de dues síndromes, la síndrome Beckwith-Wiedemann i la síndrome Russell-Silver (Smith et al., 2007), fet que indica clarament un paper clau d'IGF2 en el creixement prenatal.

El gen *Igf2* comprèn 9 exons (7-9 codons codificants) i 4 promotors i abasta una regió d'aproximadament 30 Kb. Les diferents molècules de RNA es formen després de la transcripció del gen dins la regió codificant més una de les 59 regions no traduïdes derivades dels exons 1-6. Els diferents transcrits s'expressen en funció del teixit i l'etapa del desenvolupament.

La proteïna IGF2 presenta un elevat grau d'homologia amb l'IGF1 i la insulina. Dels 67 residus aminoàcids el 62% són idèntics als d'IGF1. Al comparar les cadenes A i B dels dos polipèptids (IGF1 i IGF2) es va determinar que el 76% dels residus eren idèntics. Igual que l'IGF1, l'IGF2 no reacciona amb anticossos antiinsulina i presenta activitat promotora del creixement. La insulina humana presenta una homologia del 49% i 47% respecte l'IGF1 i l'IGF2 respectivament.

S'ha suggerit que l'IGF1 i la proinsulina es van originar com a productes diferents de la duplicació d'un gen ancestral i la divergència entre l'IGF1 i IGF2 s'hauria produït durant el curs de l'evolució dels vertebrats, possiblement en el temps d'aparició dels primers mamífers.

#### 6.2.1.2.1. *Precursors de l'IGF2*

El pre-pro-IGF2 comprèn la seqüència senyal N-terminal de 24 aminoàcids, els 67 aminoàcids del pèptid IGF2 madur, i els 89 aminoàcids del domini E de l'extrem C terminal. Després de l'escissió del pèptid senyal, el pro-IGF2 entra a les vies secretores i és processat a IGF2 madur. L'escissió proteolítica en llocs alternatius de la seqüència del domini E, en les posicions 104 i 87, produeix intermediaris anomenats "big" IGF2. Tant el pro-IGF2 com el "big" IGF2 s'han trobat en el plasma de rosegadors i humans. En humans "big" IGF2 i pro-IGF2 representen conjuntament del 10 al 30% del total de l'IGF2 (Daughaday and Trivedi, 1992; Marks et al., 2011).

L'estudi dels precursors d'IGF2 mitjançant l'ús de columnes cromatogràfiques i RIA amb anticossos policlonals contra IGF2 i diversos immunoassaigs contra l'IGF2 madur i el domini E no havien permès distingir la forma "big" de l'IGF2 i el pro-IGF2. Posteriorment però, un estudi ha permès la detecció i la mesura específica dels nivells de les tres isoformes de l'IGF2 tant en plasma humà com en el de rata mitjançant Western blot i usant un sol anticòs contra l'IGF2 madur (Qiu et al., 2007).

Pel que fa a la unió als receptors, s'ha descrit que les formes més grans de l'IGF2 poden unir-se a l'IGF1R (Valenzano et al., 1997), si bé es desconeix el nivell relatiu d'activació del receptor per "big" IGF2 i pro-IGF2. Ara bé, no hi ha estudis d'unió de "big" IGF2 o de pro-IGF2 al receptor de la insulina, tot i que s'ha documentat un augment del metabolisme de la glucosa en cèl·lules adiposes de rata després de la exposició a "big" IGF2, suggerint una possible activació del IR (Zapf et al., 1992).

D'altra banda, ha estat proposada una teoria per explicar la causa de la hipoglucèmia tumoral que es dona en pacients amb NICTH (de l'anglès nonislet cell tumor hypoglycemia), en el plasma dels quals el 1988 es van descriure per primera vegada les formes més grans de l'IGF2 (Daughaday et al., 1988). Prèviament s'havia determinat que aquestes formes més grans serien la causa de l'hipoglucèmia, ja que les cèl·lules tumorals contenen un elevada quantitat del RNAm d'IGF2, i la proporció de les formes grans respecte el total de l'IGF2 en plasma és elevada. A més, els nivells d'aquestes formes grans decreix amb la reversió de l'hipoglucèmia després de l'extracció del tumor. La teoria es basaria en el fet que "big" i/o pro-IGF2 presentarien interaccions alterades amb les IGFBP, i això portaria a que hi hagués més IGF2

lliure disponible per interactuar amb el IR, donant com a resultat la hipoglucèmia (Baxter et al., 1995). Una altra alternativa proposada és que les formes “big” i/o pro-IGF2 provocarien una major activació del IR que l'IGF2 madur, explicant el mecanisme pel qual la sobreexpressió d'IGF2 en tumors que es dona en NICTH resulta en hipoglucèmia. Ara bé, un estudi recent mostra que les formes més grans de l'IGF2 no causen una major activació, la senyalització induïda per la forma “big” és equivalent a la induïda per la forma madura, i l'activació causada per pro-IGF2 és inferior a la provocada per l'IGF2 madur i la forma “big”. Per tant, les diferències en el senyal de l'IR no explicarien necessàriament la hipoglucèmia en pacients amb NICTH (Marks et al., 2011).

### 6.2.3. Receptors

Els IGFs exerceixen els seus efectes a través de la unió a diferents receptors. Es coneixen dos receptors que uneixen de forma específica els IGFs: el receptor d'IGF1, que presenta un elevat grau de homologia amb el receptor de la insulina, i el receptor d'IGF2, que és idèntic al receptor de manosa 6 fosfat independent de catió i que actua en el tràfic dels enzims lisosomals, però pel que no es coneixen accions en la transmissió de senyals dels IGFs. Per altra banda, el receptor de la insulina, que uneix els IGFs amb baixa afinitat, també participa en l'activació dels senyals promogudes pels IGFs, així com els receptors híbrids, formats per hemireceptors IGF/IR que uneixen els IGFs i transmeten senyals citoplasmàtiques. IRR és un receptor orfe del que no es coneix el lligand, i per tant, sols participa en la senyalització al heterodimeritzar amb un hemireceptor dels membres de la família (Zhang and Roth, 1992).

#### 6.2.3.1. El receptor d'IGF1 (IGF1R)

El receptor d'IGF1 juga un paper central en la transducció de senyal del sistema. Aquest receptor es sintetitza com a polipèptid de cadena simple, i posteriorment és modificat post-traduccionalment per eliminació del pèptid senyal de 30 aminoàcids i escissió del proreceptor per tal de generar la subunitat  $\alpha$  extracel·lular de 706 aminoàcids i la subunitat  $\beta$  transmembrana de 626 aminoàcids. Les subunitats  $\alpha$  i  $\beta$  s'uniran mitjançant ponts disulfur per

formar un hemireceptor  $\alpha\beta$ , que al seu torn s'unirà a un altre hemireceptor  $\alpha\beta$  a través de ponts disulfur entre les subunitats  $\alpha$  per formar l'holoreceptor madur  $\alpha_2\beta_2$ .

Els receptors de la insulina i l'IGF1 són heterotetramers  $\alpha_2\beta_2$  amb subunitats d'igual mida i regions amb seqüències d'alta homologia, d'entre el 50-60% d'identitat total i amb un 84% d'homologia en el domini  $\beta$  citoplasmàtic catalític amb activitat tirosina quinasa, altament conservat. La principal diferència estructural entre l'IR i l'IGF1R són les regions riques en cisteïnes de la subunitat  $\alpha$  que confereixen l'especificitat d'unió del lligand.

L'autofosforilació en els residus tirosina en resposta a la unió del lligand es dona en els receptors de l'IGF1 i de la insulina com una reacció intramolecular en trans on les tirosina quinases de la subunitat  $\beta$  fosforilen els residus de l'altre subunitat  $\beta$  de l'holoreceptor  $\alpha_2\beta_2$ . S'ha demostrat que l'activitat tirosina quinasa de les subunitats  $\beta$  tant de l'IGF1R com de l'IR són essencials per la senyalització dels receptors, per exemple en el cas del receptor de la insulina, mutacions en el domini catalític de la subunitat  $\beta$  s'han establert com a causes de la resistència a la insulina.

L'estructura dels dominis externs explica moltes de les característiques de la unió dels lligands (Lawrence et al., 2007). En relació amb la membrana plasmàtica, el domini extern presenta una conformació plegada en la qual els dos hemireceptors es situen de forma antiparal·lela i envolten el lloc d'unió del lligand. Malgrat l'estructura dimèrica del receptor, tant sols una molècula del lligand pot fer tots els contactes requerits per la unió d'alta afinitat, i per tant, la unió demostra cooperativitat negativa, ajustant-se a un model oscil·latori harmònic (Kiselyov et al., 2009).

La deleció específica en les cèl·lules beta del IGF1R no modifica el desenvolupament i creixement de les cèl·lules beta, però s'observa una expressió reduïda de Glut2 i de la glucoquinasa en les cèl·lules beta, la qual cosa resulta en una secreció d'insulina estimulada per glucosa defectiva i una tolerància a la glucosa alterada. Per tant, el receptor d'IGF1 no és crucial pel desenvolupament de les cèl·lules beta, la massa beta no es veu alterada, però participa en el control de la seva funció diferenciada (Kulkarni et al., 2002).

### 6.2.3.2. El receptor d'IGF2 (IGF2R)

El receptor d'IGF2 no està relacionat estructuralment ni amb el receptor d'IGF1 ni amb el de la insulina, es tracta d'una proteïna transmembrana de cadena simple, d'aproximadament 300 KDa amb un llarg domini extracitoplasmàtic format per 15 repeticions homologues i una cua intracel·lular que no presenta activitat tirosina quinasa intrínseca, però que té llocs de fosforilació en residus tirosina i serina i és substrat per tirosines quinases, proteïna quinasa C o quinases dependents d'AMPc. El receptor d'IGF2 és idèntic al receptor de la manosa 6 fosfat independent de catió i uneix IGF2 i glicoproteïnes que contenen manosa-6-P, i s'ha descrit que pot mitjançar accions a través de proteïnes G, ara bé, el seu rol en la transducció de senyal no està clar.

En el context de la biologia dels IGFs es creu que la seva funció, al menys en part, és la internalització i degradació de l'excés d'IGF2 (Scott and Firth, 2004), i per tant tindria una funció inhibidòria sobre les accions d'IGF2. Evidències recents suggereixen que l'IGF2R també té un rol directe en la senyalització que involucra l'activació d'ERK (de l'anglès extracellular-signal-regulated kinase), mitjançada per la esfingosina quinasa dependent de l'activació dels receptors de esfingosina-1-fosfat (El-Shewy et al., 2007).

### 6.2.3.3. El receptor de la insulina (IR).

El receptor d'insulina (IR) humà està codificat per un gen de 22 exons que comprèn 120 kb i està localitzat en el cromosoma 19. Existeixen dues isoformes del receptor de la insulina (IR) que difereixen per la presència (IR-B) o absència (IR-A) de 12 aminoàcids en l'extrem carboxiterminal de la subunitat  $\alpha$ , i que són resultat del processament alternatiu de la seqüència codificada en l'exó 11. En el receptor tipus 1 dels IGFs (IGFR1) la seqüència corresponent és inexistent.

L'abundància relativa de les dues isoformes està regulada de forma teixit específica tant en humans com en rata (Goldstein and Dudley, 1990; Moller et al., 1989) i també per l'etapa del desenvolupament i la diferenciació cel·lular, sent l'IR-A l'isoforma predominant en els teixits fetals i les cèl·lules cancerígenes (Frasca et al., 1999).

IR-B, és l'IR "clàssic" i la isoforma més abundant en múscul, fetge i teixit adipós. La insulina s'uneix amb afinitat similar a les dues isoformes del receptor d'IR, però els IGFs i en particular IGF2, presenten una major afinitat per l'IR-A que per l'IR-B, sent l'IR-A un mitjancer important de les accions d'IGF2 a concentracions fisiològiques. Alguns estudis han indicat que l'IR-B podria resultar en senyals metabòliques més eficients i l'IR-A desencadenaria senyals de tipus mitogènic (Belfiore et al., 2009).

Ara bé, es coneix molt poc sobre els detalls moleculars subjacents a la senyalització diferencial de l'IR per diferents lligands. S'ha suggerit que aquestes diferències poden estar associades a un reclutament i activació diferencial de les molècules substrat de l'IR, així com en canvis en l'expressió gènica. Diversos treballs han utilitzat anàlegs de la insulina, pèptids mimètics i anticossos contra l'IR amb l'objecte d'estudiar la interacció entre el lligand i el receptor a nivell molecular, per establir correlacions amb la senyalització. A més, l'acció de l'IR pot estar modulada pel seu grau de fosforilació, en aquest sentit s'ha descrit que la via de l'Akt pot ser completament activada amb nivells de fosforilació menors als necessaris per activar totalment la via de les MAPK (Jensen and De Meyts, 2009). Per tant, les diferències en les respostes biològiques estimulades per diferents lligands a través de l'IR poden reflexar diferents graus de fosforilació del receptor o bé diferents localitzacions (superfície cel·lular vs compartiment endosomal) del receptor, fet que influeix en les molècules senyalitzadores disponibles per ser fosforilades per l'IR. Per altra banda, també s'ha descrit la localització en microdominis diversos de la membrana plasmàtica de l'IR-A i l'IR-B en les cèl·lules beta (Uhles et al., 2003).

El knockout teixit específic de l'IR en les cèl·lules beta, dona com a resultat un ratolí que presenta una pèrdua selectiva de secreció d'insulina en resposta a glucosa i un empitjorament progressiu de la tolerància a la glucosa. Aquestes dades indiquen un paper funcional important del receptor de la insulina en la sensibilitat a la glucosa en les cèl·lules beta pancreàtiques, i suggereix que defectes en la senyalització de la insulina a nivell de la cèl·lula beta poden contribuir a l'alteració de la secreció d'insulina observada en la diabetis tipus 2 (Kulkarni et al., 1999).

#### 6.2.3.4. Els receptors híbrids

Existeix encara un grau de complexitat addicional amb l'heterodimerització de pro-receptors de les dues isoformes del receptor de la insulina (IR-A i IR-B) i el receptor homòleg IGF1R, que per assemblatge post-traducciona generaran receptors híbrids insulina/IGF.

L'heterodimerització es dona amb eficiència similar a l'homodimerització, de tal manera que si un receptor s'expressa en excés, el menys abundant s'acobla en gran mesura formant receptors híbrids. Els receptors híbrids uneixen els IGFs amb afinitat similar, però uneixen la insulina amb afinitat substancialment inferior que l'IR (Belfiore et al., 2009). No està encara clar si els receptors híbrids tenen rols fisiològics diferents.

#### 6.2.3.5. Afinitat dels lligands pels diferents receptors

L'IGF1, l'IGF2 i la insulina presenten afinitats diferencials pels diferents receptors. La insulina s'uneix amb alta afinitat a l'IR-A i l'IR-B però només s'uneix a IGR-IR a nivells suprafisiològics, ja que presenta una afinitat de 100 a 1000 vegades inferior que l'IGF1.

L'IGF1 s'uneix amb alta afinitat a l'IGF1R i amb afinitat significativament inferior a les isoformes del receptor de la insulina, unes 100 vegades inferior que la insulina.

L'IGF2 s'uneix a l'IGF1R amb quatre vegades menor afinitat que l'IGF1, ara bé IGF2 s'uneix amb elevada afinitat a l'IR-A, només lleugerament inferior que la insulina (Frasca et al., 1999)(Fig. 13), una propietat que ve donada pel seu domini C (Denley et al., 2006). Aquesta observació implica que la senyalització pels IGFs, i en particular per l'IGF2, que està desregulada en un elevat nombre de patologies, ha de tenir en compte tant la transducció a través de l'IGF1R com de l'IR-A.

Finalment, en aquelles cèl·lules en que es coexpressen l'IR i l'IGF1R, i es dona la formació de receptors híbrids de IR-A o IR-B i IGF1R (Soos et al., 1990), la insulina rarament s'uneix a aquests receptors, l'IGF1 pot unir-se tant els híbrids que contenen IR-A com IR-B i IGF2 s'uneix principalment als híbrids que contenen IR-A (Belfiore et al., 2009).

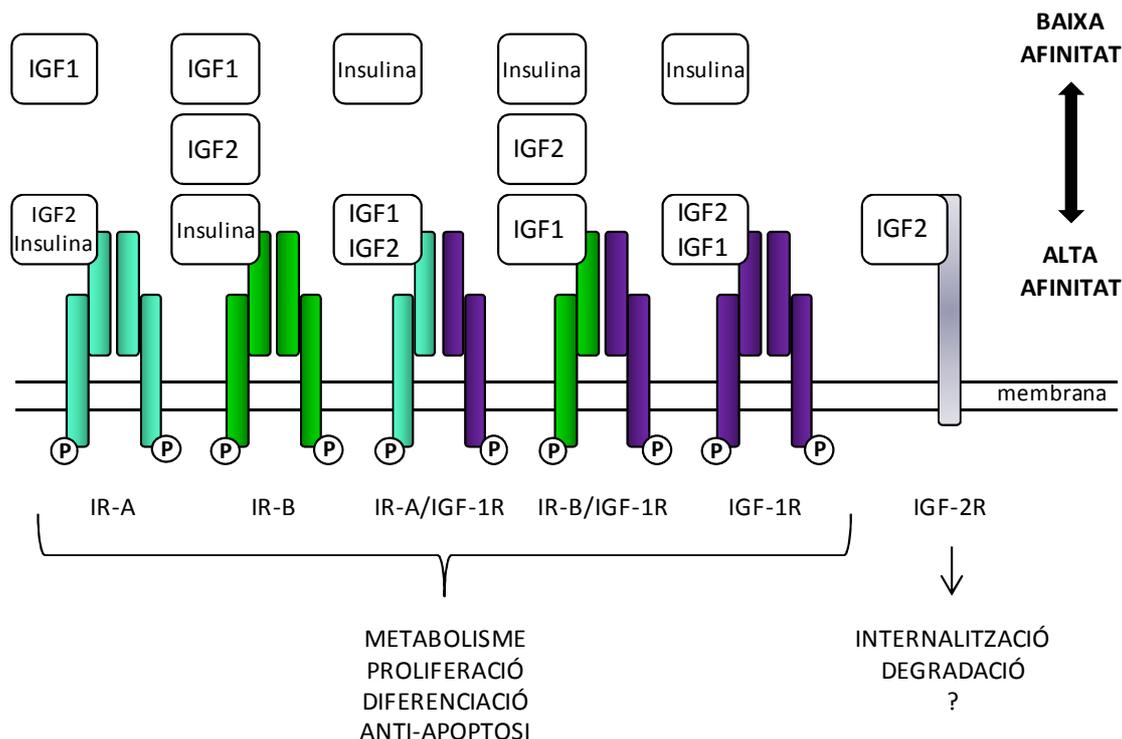


Figura 13. Representació esquemàtica de l'afinitat dels diferents lligands (IGF1, IGF2 i insulina), pels diversos tipus de receptors (IGF1R, IGF2R, IR i receptors híbrids).

#### 6.2.4. Les proteïnes d'unió als IGFs (IGFBP)

Sis proteïnes d'unió d'alta afinitat (IGFBP1-IGFBP6), i diverses proteïnes d'unió de baixa afinitat, conegudes com proteïnes relacionades amb les IGFBP (IGFBP-rPS) uneixen els factors de creixement IGF1 i IGF2. Les IGFBPs presenten diferents graus d'afinitat pels IGFs. IGFBP1 - IGFBP5 tenen afinitats més altes per l'IGF1, mentre que IGFBP6 té una major afinitat per l'IGF2 (Firth and Baxter, 2002). Les IGFBP tenen també la capacitat d'unir la insulina, però ho fan amb una molt baixa afinitat (Hwa et al., 1999).

Els complexos IGF/IGFBP exerceixen dues funcions principals: En primer lloc, estableixen els IGFs i els protegeixen de la degradació, perllongant així la seva vida mitja, d'uns pocs minuts a diverses hores. En segon lloc, inhibeixen la unió dels IGFs als seus receptors. Per tant, només els IGFs que s'alliberen de les IGFBPs per dissociació o mitjançant escissió mediada per la proteasa d'IGFBP, poden unir-se als receptors i activar els senyals dels IGFs (Firth and Baxter, 2002; Hwa et al., 1999). En general, aquests efectes són similars i, en part, redundants per a

totes les IGFbps. No obstant això, les diferents afinitats, estructures i modificacions post-traduccionals de les IGFbps (Hwa et al., 1999), la presència de proteases específiques de les IGFbps (Sadowski et al., 2003) i els components de la matriu extracel·lular d'unió a les IGFbps (Nam et al., 2002), influeixen en els efectes d'aquestes proteïnes d'unió i permeten un ajust fi de les interaccions dels IGFs i les IGFbps tant en diferents teixits com en diferents regions d'un mateix teixit.

Malgrat que la unió dels IGFs a les IGFbps sol ser inhibidora pel que fa a l'activació dels receptors, en certes circumstàncies les IGFbps poden promoure la senyalització dels IGFs i poden tenir efectes pro-oncogènics. Les IGFbps estableixen i alliberen lentament els IGFs perquè interaccionin amb els receptors, el que impedeix la regulació negativa del receptor per una alta exposició als IGFs. Per tant, poden promoure una activació del receptor prolongada i constant (Firth and Baxter, 2002).

A més de les seves funcions en els complexos amb els IGFs, les IGFbps i IGFbps-rPs exerceixen efectes que són independents de la unió als IGFs, són els senyals específics de les IGFbps. Per exemple, s'ha descrit que la IGFbps-3 actua com a proteïna anti-cancerígena mitjançant la inhibició de la proliferació, l'adhesió i la motilitat per mecanismes independents dels IGFs (Firth and Baxter, 2002). També s'ha demostrat que l'IGFBP-rP1 (IGFBP7) té un paper central en la senescència i l'apoptosi mediada per BRAF en cèl·lules de melanoma (Wajapeyee et al., 2008). En conjunt, els complexos IGF/IGFBP estan fortament regulats i modulen el senyal dels IGFs i la insulina influïent en el ratio dels IGFs i la insulina lliures, estabilitzant els factors de creixement, la unió als receptors i la durada de l'activació del receptor.

### 6.2.5. Transducció del senyal de la insulina i els IGFs.

Malgrat la seva considerable homologia estructural, la transducció del senyal a través dels receptors de la insulina i l'IGF1 dona lloc a events fisiològics diferents, tot i existir un cert grau de solapament. Per tant, la insulina i els IGFs exerceixen rols fisiològics diferents però utilitzen les mateixes vies de senyalització, en les que hi participen la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) i la proteïna-quinasa B (PKB o Akt) o la cascada de les MAP quinases (per mitogen-activated protein), amb activació de la proteïna d'unió a GTP Ras, mediadors de les respostes a molts estímuls cel·lulars. L'especificitat estímulo/resposta és atribuïble en gran part al patró

d'expressió dels receptors, però aquest no és l'únic mecanisme que contribueix a l'especificitat del senyal. S'assumeix àmpliament que l'especificitat també ve donada per les diferències en la capacitat d'unió del lligand. A més, De Meyts et al. van proposar que el que determina si el tipus d'activitat que es desencadena és de tipus metabòlic o mitogènic és el resultat del retard en la dissociació que té el lligand del receptor, sense tenir en compte si aquest és l'IGF1R o l'IR (De Meyts et al., 1995), i argumenten que la duració del senyal determina el tipus d'efectes metabòlics vs mitogènics (Hansen et al., 1996). De manera addicional, l'existència de diferències subtils però importants entre l'IR i l'IGF-1R, com és el número de tirosines en el domini intracel·lular (13 en IR i 15 en IGF1R), poden donar lloc a una activitat diferencial (Kato et al., 1994; O'Connor et al., 1997). Cada vegada és també més clar que la associació preferencial amb substrats que senyalitzen de forma directa a través d'una o altre de les principals cascades de senyalització també juga un paper important en la determinació de l'efecte final biològic de la unió del lligand a IR o a IGF1R. Per altra banda, ambdós receptors també s'associen amb proteïnes citoplasmàtiques, com Grb10, les proteïnes 14-3-3 i proteïnes G específiques (Laviola et al., 2007), i en la mesura que es dona aquesta associació per l'IGF1R, en comparació a l'IR, aquest fet pot representar un nivell addicional d'especificitat en la senyalització.

#### 6.2.5.1. Conseqüències biològiques de la senyalització dels IGFs

Els efectes de la insulina *in vivo* són predominantment metabòlics, i engloben la utilització per part del múscul, el fetge i el teixit adipós, de proteïnes, lípids i carbohidrats. Pel contrari, els IGFs actuen principalment com a factors mitogènics i antiapoptòtics promovent la diferenciació i la proliferació en diferents tipus cel·lulars. Les bases fisiològiques d'aquestes diferències, com s'ha esmentat anteriorment, es troben, al menys parcialment, determinades per l'expressió i distribució dels receptors. Per tant, hepatòcits, adipòcits i múscul esquelètic, principals dianes de l'acció de la insulina, presenten elevats nivells d'expressió de la isoforma B del receptor de la insulina i baixos nivells d'expressió del receptor d'IGF1. Pel contrari, en fibroblasts i diversos tipus de cèl·lules progenitores indiferenciades, trobem un patró d'expressió dels receptors oposat. Estudis realitzats en ratolins knockout per IR i IGF1R ho recolzen, mostrant que l'ablació de l'IR condueix a un desenvolupament embrionari relativament normal amb una reducció modesta, sobre el 10%, en el creixement corporal, però amb una mortalitat

prematura als pocs dies després del naixement com a resultat de la cetoacidosi diabètica (Accili et al., 1996). Per altra banda, els ratolins knockout per IGF1R neixen amb un profund retard en el creixement, anormalitats en músculs, os i pell i moren a les poques hores de néixer degut a deficiències respiratòries (Liu et al., 1993).

L'anàlisi de l'expressió dels gens regulats per la insulina via l'IR i pels IGFs a través de l'IGF1R ha permès conèixer millor els diferents efectes fisiològics d'aquestes proteïnes. L'IGF1 indueix de manera específica gens implicats principalment en mitogènesi i diferenciació, la insulina en canvi, regula un ampli espectre de gens involucrats en diversos processos cel·lulars (Dupont et al., 2001). L'activació d'un determinat receptor per diferents lligands pot també tenir efectes en l'expressió gènica, d'aquesta manera la insulina i l'IGF2 provoquen canvis específics en l'expressió gènica a través de l'IR-A, malgrat els dos lligands presenten afinitat similar pel receptor. En una línia cel·lular sense expressió d'IGF1R que sobreexpressa IR-A, IGF2 indueix més i diferents gens que la insulina, incloent aquells implicats principalment en la transducció de senyal i el cicle cel·lular, el metabolisme, l'angiogènesi, la invasió i l'adherència (Pandini et al., 2003).

Les ben conegudes accions proliferatives dels IGF són en gran part el resultat dels seus efectes sobre la progressió del cicle cel·lular a través de canvis en la transcripció, la traducció i les modificacions post-traduccionals dels efectors del cicle cel·lular, incloent les ciclines, les quinases dependents de ciclines i els seus inhibidors (Dupont et al., 2003). Els IGFs poden influir en diversos punts de la progressió del cicle cel·lular, però el seu impacte és predominant en la transició G1-S i està mitjançat per les vies PI3K/Akt i ERK (Samani et al., 2007).

Els efectes proliferatius dels IGFs són crucials per al desenvolupament normal del fetus, i durant el període postnatal i en la pubertat pel desenvolupament dels ossos, la pell, els músculs i en pràcticament tots els sistemes d'òrgans del cos, i durant l'edat adulta els IGFs són importants en la regeneració i remodelació tissular.

Els seus potents efectes mitogènics, però, també els converteixen en objectius per a les teràpies contra el càncer. Nombrosos estudis han demostrat que la inhibició de la senyalització d'IGF1R evita la proliferació de cèl·lules canceroses *in vitro* i el creixement de tumors *in vivo* (Gallagher and LeRoith, 2010; Samani et al., 2007). Existeixen diversos fàrmacs que s'han avaluat en estudis preclínic o clínic per el bloqueig d'IGF1R en el càncer, incloent anticossos

per neutralitzar l'accés del lligand, causant disminució de l'expressió del receptor i usant inhibidors de l'activitat tirosina quinasa.

Els senyals de supervivència enviats a través d'IGF1R protegeixen les cèl·lules dels estímuls pro-apoptòtics. S'han proposat les vies PI3K/AKT i Ras/MAPK, parcialment redundants, implicades en aquesta senyalització. Qualsevol d'aquestes vies és necessària per a promoure la supervivència cel·lular mitjançada per l'IGF1R (Navarro and Baserga, 2001).

L'efecte protector que ofereixen sembla ser particularment important en el cervell, en el qual juguen un paper en la plasticitat neuronal i la funció cognitiva i poden exercir efectes neuroprotectors en condicions patològiques com la corea de Huntington i l'Alzheimer (Torres-Aleman, 2010), en la preservació de la funció normal del miocardi (Wang, 2001) i en el desenvolupament de la glàndula mamària durant l'embaràs i la lactància (Neuenschwander et al., 1996).

#### 6.2.6. Vies de senyalització

La unió del lligand al receptor dimèric comporta el reordenament de l'estructura quaternària del receptor, que resulta en l'autofosforilació dels residus específics del domini quinasa. Aquesta autofosforilació del receptor desencadenarà una sèrie de múltiples fosforilacions intracel·lulars i l'activació de les vies de senyalització que, en últim terme, comportaran els efectes de creixement, diferenciació, proliferació i supervivència dels IGFs.

Les principals vies de senyalització mitjançant les quals el IR i el IGF1R regulen el metabolisme i l'expressió de gens i en les quals les quinases serina Akt/PKB i la quinasa MEK tenen un paper central, estan ben establertes (Adams et al., 2004; Cohen, 2006; Laviola et al., 2007) (Fig. 14). L'activació d'aquestes quinases és dependent de la fosforilació dels substrats del receptor d'insulina o IRSs (1-4), en les cèl·lules beta és especialment important l'IRS2. Un cop fosforilat l'IRS2 queda anclat als residus de fosfotirosina de la subunitat  $\beta$  del receptor a través del seu domini PTB, situat en la regió N-terminal. Aleshores l'IRS2, és capaç de segrestar a la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) a través del domini SH2 de la seva subunitat reguladora, la p85, provocant, al seu torn, l'activació de la subunitat catalítica de 110 kDa (p110). La PI3K activada transforma els fosfatidilinositols difosfat (PIP2) de la membrana plasmàtica, en fosfatidilinositols trifosfat (PIP3), els quals actuen com a missatgers secundaris activant a la

proteïna quinasa dependent de fosfoinosítidos (PDK1) i a determinades isoformes de la proteïna quinasa C (PKC). La PDK activa, a continuació, a la proteïna quinasa B (PKB, també anomenada Akt) i a diverses isoformes atípiques de la PKC. L'Akt és una serina/treonina quinasa que té una gran quantitat de proteïnes substrat, entre les que s'inclou la glicogen sintasa quinasa-3 (GSK3), l'activitat de la qual és inhibida per fosforilació; per contra, té altres dianes que en ser fosforilades s'activen, com la diana en mamífers de la rapamicina (mTOR), que al seu torn activa la p70S6K i la 4E - BP1 implicades, totes dues, en la síntesi de proteïnes. L'Akt també pot fosforilar directament en serina/treonina a determinats factors de transcripció, els quals per la seva banda contribueixen a promoure l'entrada al cicle cel·lular.

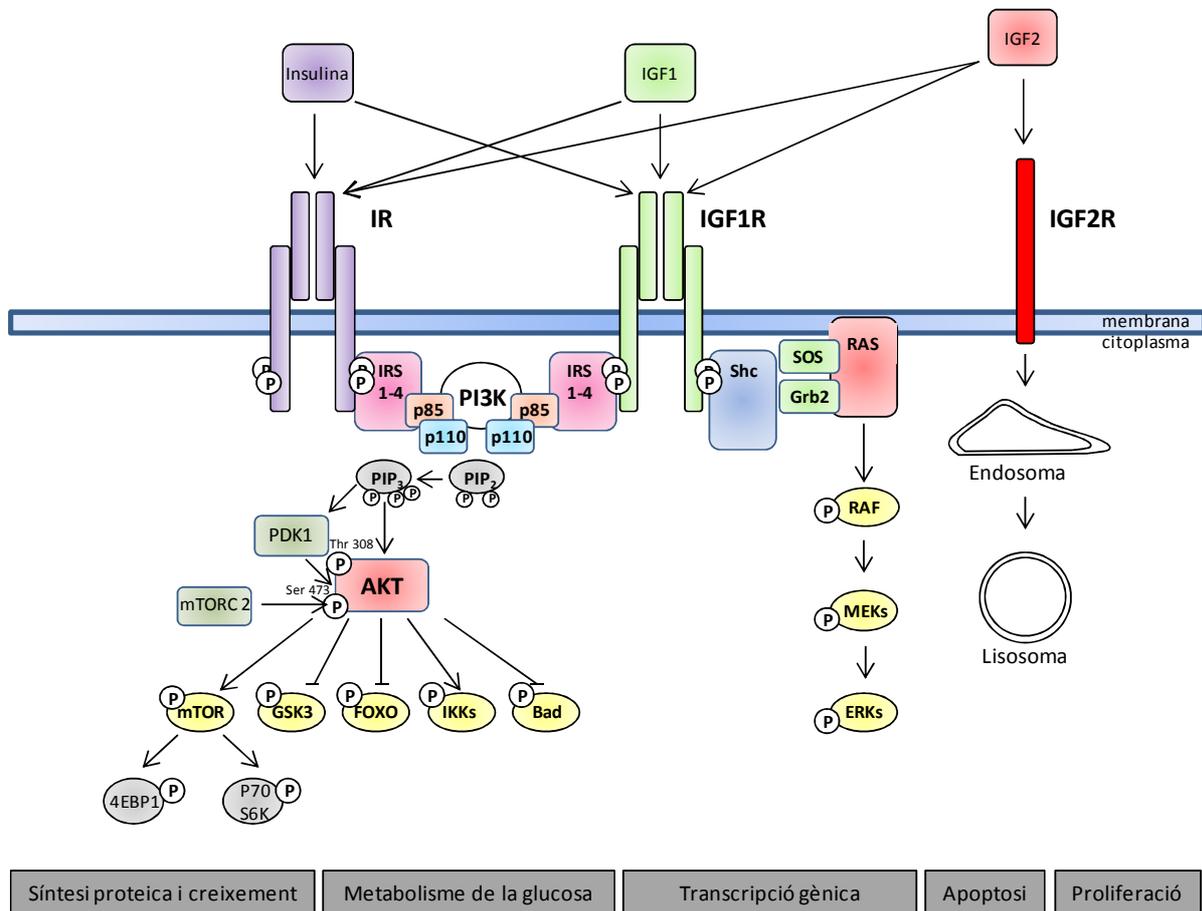


Figura 14. Esquema de les principals vies de senyalització activades per la insulina i els IGFs i mecanismes sobre els que actuen.

D'altra banda, la unió del lligand al receptor provoca també l'activació de la via de les proteïnes quinases activades per mitògens (MAPK). Aquesta activació s'aconsegueix per la interacció de la proteïna adaptadora Grb-2 amb les tirosines fosforilades del receptor o de l'IRS2, a través dels seus dominis SH2, o per la unió de proteïnes Shc. Al seu torn, Grb2 s'uneix a mSOS, una molècula intercanviadora del nucleòtids de guanina de la proteïna Ras, la qual resulta activada per aquesta acció. La forma Ras-GTP s'uneix a Raf que fosforila llavors a la kinasa MEK, resultant en la fosforilació-activació de Erk1/2. L'activació de les ERKs o p42/44MAPK condueix a l'activació d'una altra kinasa, la p90RSK, el que indueix la translocació d'aquesta al nucli o bé, les mateixes ERKs poden translocarse directament. Al nucli fosforilaran a determinats factors de transcripció afavorint la mitogènesis i la transcripció de diversos gens com el de la insulina. L'activació de la ruta de les MAPKs i de la PI3K és un requisit essencial per a la mitogènesis de la majoria de les cèl·lules dels mamífers .

És important destacar que la glucosa pot activar la via de transducció de senyal mediada pels IRSs, independentment dels IGFs (Hügl et al., 1998). S'ha vist que concentracions estimulants de glucosa (6-18 mM), poden promoure l'associació d'IRS2 amb la subunitat reguladora p85 de la PI3K, o d'IRS2 amb Grb2/mSOS (Hügl et al., 1998). D'altra banda, la glucosa pot conduir, de manera no dependent d'IRS2 , a l'activació d' Erk1/2 i de p70S6K .

### **6.3. l'IGF2 i la cèl·lula beta**

IGF2 exerceix accions endocrines, paracrines i autocrines pràcticament en tots els teixits (Efstratiadis, 1998), i la seva importància en el creixement prenatal en rosegadors s'ha demostrat en diferents models. S'ha descrit que ratolins knockout per IGF2 presenten creixement intrauterí retardat (DeChiara et al., 1990). Ratolins heterozigots portadors de l'al·lel patern d'IGF2 mutat i ratolins nulizigots per IGF2, és a dir que no posseeixen cap còpia del gen, són nans viables amb aproximadament un 60% del pes normal al moment del neixement, i, a excepció d'un lleuger retard en l'ossificació, no presenten anomalies en el desenvolupament. Quan l'al·lel disruptat és el d'origen matern, la descendència resulta fenotípicament normal, ja que l'al·lel matern es troba silenciada per l'imprompta gnòmica (DeChiara et al., 1990). La sobreexpressió d'IGF2, pel contrari, augmenta la mida corporal fins a un 160% (Sun et al., 1997), i fins el 200% a dia E17 (Eggenchwiler et al., 1997) de forma dosi-dependent. De

manera paral·lela es pot augmentar la mida d'òrgans individuals proporcionalment als seus nivells d'IGF2, el que suggereix un control autocrí o paracrí (Sun et al., 1997).

En el pàncrees, l'IGF2 actua com a promotor de la proliferació i la supervivència de les cèl·lules beta pancreàtiques (Vasavada et al., 2006). Durant el desenvolupament del pàncrees, IGF2 juga un paper important en la regulació del creixement i la diferenciació de l'illot, en aquest període és molt més important que l'IGF1. En rosegadors, l'expressió d'IGF2 és màxima durant el desenvolupament embrionari, moment en que es detecten altes concentracions, tant de la forma madura de l'IGF2 com les dues formes dels seus precursors, en el plasma i en els teixits fetals (Marks et al., 2011; Qiu et al., 2007). En l'etapa neonatal primerenca les cèl·lules de l'illot pateixen un pic d'apoptosi que assoleix el seu màxim en el pàncrees de rata a dia 14 postnatal (Scaglia et al., 1997), aquest fenomen coincideix temporalment amb la disminució de l'expressió d'IGF2 (Hill et al., 2000; Petrik et al., 1998).

En fetus i nounats el RNAm d'IGF2 es troba en gran part associat a les cèl·lules pancreàtiques endocrines. Tot i que no es troba limitat a un sol tipus cel·lular, el pèptid presenta una distribució similar al RNAm, però la seva presència és major en el cuore de l'illot. Ara bé, els nivells de la forma madura de l'IGF2 baixen clarament en el sèrum de rata adulta. En canvi, en humans tant l'RNAm com la proteïna són presents dins les cèl·lules de l'illot al llarg de tota la vida, així com els receptors mitjançant els quals desencadena la seva acció biològica (van Haeften and Twickler, 2004; Van Schravendijk et al., 1987). Ara bé, el rol d'IGF2 en el període post natal no és encara ben conegut.

En les cèl·lules beta del pàncrees s'expressen tant el IGF1R (Fehmann et al., 1996) com el IR, concretament la isoforma B del IR és la que s'expressa de manera predominant en les cèl·lules beta en humans (Muller et al., 2007), suggerint que la interacció IGF/IR-A no té un paper rellevant en la fisiologia pancreàtica i que els efectes de l'IGF2 en les cèl·lules beta humanes estan mitjançats per IGF1R, que és abundant en les cèl·lules beta (Fehmann et al., 1996; Van Schravendijk et al., 1987).

Els efectes d'IGF2 en els illots pancreàtics han estat demostrats tant *in vitro* com *in vivo*. *In vitro* s'ha descrit que IGF2 promou la síntesi de DNA en línees cel·lulars beta, en illots de rata i illots fetals humans (Asfari et al., 1995; Hogg et al., 1993; Huotari et al., 1998; Iliava et al., 1999). *In vivo* els efectes mitogènics d'IGF2 s'han posat de manifest en ratolins transgènics que

sobreexpressen el factor de creixement (Petrik et al., 1999a), en aquests ratolins es demostra que la sobreexpressió d'IGF2 en la vida fetal té un profund efecte en la morfologia dels illots, causant hiperplàsia i reduint l'apoptosi de les cèl·lules de l'illot. També s'ha determinat en rates (Goto-Kakizaki), model espontani de diabetes tipus 2, que defectes en l'expressió d'IGF2 i d'IGF1R precedeixen a la disminució de la massa beta, mentre que la suplementació d'IGF2 provoca una expansió de la massa de cèl·lules beta (Calderari et al., 2007).

En l'adult la pèrdua de l'imprinting d'IGF2 (LOI) i la seva re-expressió s'han confirmat en el càncer (Cui, 2007). En un model de ratolí, la disrupció dels dos al·lels d'IGF2 va reduir el creixement neoplàsic de les cèl·lules beta (Christofori et al., 1995), el que suggereix que, almenys sota aquestes condicions, la prevenció de la re-expressió d'IGF2 en l'adult pot restringir el creixement de les cèl·lules beta neoplàsiques.

En illots adults, les accions d'IGF2 com a factor de supervivència s'han determinat en rates alimentades amb una dieta baixa en proteïnes (Petrik et al., 1999b) i en un model de trasplantament d'illots encapsulats, en que s'ha mostrat que la incubació dels illots amb IGF2, prèviament al trasplantament, redueix la seva mort (Robitaille et al., 2003).

Per tant, IGF2 podria tenir un doble rol beneficiós en la massa beta, actuant sobre les cèl·lules beta pancreàtiques com a factor mitogènic i com a factor de supervivència.

D'altra banda, és conegut que les citocines inhibeixen l'expressió dels IGFs en diversos tipus cel·lulars (Ilvesmäki et al., 1993; Lin et al., 1994; Martin et al., 1993), i s'ha trobat una reducció de la immunoreactivitat d'IGF2 en les cèl·lules d'illots sotmesos a insulitis (Hill et al., 1999), suggerint també que les citocines poden inhibir l'expressió d'IGF2 en els illots. Malgrat dades prèvies indiquen que l'addició d'IGF2 *in vitro* provoca una reducció de l'apoptosi induïda per citocines en illots de rata i ratolí (Hill et al., 1999) i una reversió de la disminució de la viabilitat (Petrik et al., 1998), existeixen alguns estudis que mostren la manca d'efectes d'IGF2 sobre l'apoptosi induïda per IL-1 $\beta$  (Raile et al., 2003), i no es coneix si IGF2 pot modificar la supressió de la replicació induïda per la citocina.

Ara bé, està documentat un rol autocrí d'IGF2 en la protecció de les cèl·lules beta contra l'apoptosi (Cornu et al., 2009). En aquest treball Cornu i col·laboradors descriuen que GLP-1

estimula fortament l'expressió del receptor d'IGF1 i la fosforilació d'Akt i que aquest augment de la fosforilació d'Akt depèn de l'expressió del receptor d'IGF1 però no de la del receptor d'insulina. Demostren que la fosforilació d'Akt induïda per GLP-1 requereix la secreció activa, el que indica la presència d'un mecanisme d'activació autocrina, i evidencien que l'activació de la senyalització del receptor d'IGF1 depèn la secreció d'IGF2 que actua com a regulador autocri. En definitiva, demostren l'existència d'un bucle autocri IGF2/IGF1R que opera en les cèl·lules beta i que GLP-1 augmenta aquesta activitat incrementant l'expressió del receptor d'IGF1 i estimulant la secreció d'IGF2.

També és de destacar l'associació descrita entre la IGFBP-2, que s'uneix als elements líder de les regions no traduïdes dels transcripts d'IGF2, i regula la traducció d'IGF2 durant el desenvolupament tardà (Nielsen et al., 1999) i la diabetis tipus 2 (Saxena et al., 2007; Scott et al., 2007; Zeggini et al., 2007).

Per altra banda, cal fer menció d'alguns estudis que han suggerit que la sobreexpressió d'IGF2 pot tenir efectes deleteris en les cèl·lules beta. Entre ells s'ha descrit que ratolins transgènics que sobreexpressen IGF2 presenten illots amb una arquitectura disrupcionada, forma irregular i major tamany del normal (Devedjian et al., 2000; Petrik et al., 1999a), amb corbes dosi-resposta de secreció d'insulina i concentració de glucosa alterades i desenvolupament de diabetis (Devedjian et al., 2000). També s'ha determinat que els animals transgènics per IGF2 presenten una major susceptibilitat al dany cel·lular beta, i els doble transgènics INF- $\gamma$ /IGF2 desenvolupen diabetis de manera espontània

Així doncs, malgrat IGF2 pot tenir efectes beneficiosos en les cèl·lules beta, actuant com a factor mitogènic i de supervivència, les dades obtingudes en animals transgènics suggereixen que la seva sobreexpressió podria augmentar la susceptibilitat dels illots al dany cel·lular beta.

Per tant, és d'interès determinar els efectes de la sobreexpressió d'IGF2 en el trasplantament d'illots, ja que les seves característiques com a factor mitogènic i anti-apoptòtic en els illots el converteixen en un candidat particularment atractiu per millorar el pronòstic del trasplantament mitjançant l'increment o la preservació de la massa beta trasplantada.

**HIPÒTESI I OBJECTIUS**



**Raonament:**

Els primers dies després del trasplantament d'illots pancreàtics es produeix una important pèrdua del teixit trasplantat, que es correspon amb elevats nivells d'apoptosi i necrosi de les cèl·lules beta, conjuntament amb una limitació en la proliferació d'aquestes cèl·lules. Atès que el nombre d'illots que sobreviu el trasplantament és baixa, una mínima pèrdua addicional pot determinar la recurrència de la hiperglucèmia i, per tant, la preservació o la regeneració de la massa beta trasplantada pot ser una bona estratègia per millorar el pronòstic del trasplantament.

El nostre grup ha suggerit que la interleucina-1 (IL-1) pot estar implicada en la fallada del trasplantament d'illots. Els primers dies després del trasplantament hem detectat l'expressió d'IL-1 $\beta$  en els empelts. Hem demostrat que la IL-1 juga un paper important en la pèrdua de la massa beta trasplantada, ja que amb la inhibició del seu efecte s'aconsegueix augmentar la replicació i la massa de les cèl·lules beta i millorar el pronòstic del trasplantament. Proposem que estratègies orientades a reduir l'expressió de la IL-1 $\beta$  a l'empelt o contrarestar les seves accions deletèries sobre els illots trasplantats podrien millorar el pronòstic de l'empelt.

El factor de creixement similar a la insulina 2 (IGF2) és un potent factor de creixement que té un rol important promovent la diferenciació i la proliferació cel·lular i actuant com a factor de supervivència, limitant l'apoptosi en diferents tipus cel·lulars. Els efectes d'IGF2 en els illots pancreàtics han estat demostrats tant *in vitro* com *in vivo*. *In vitro* s'ha descrit que IGF2 promou la síntesi de DNA en línees cel·lulars beta, en illots de rata i illots fetals humans. *In vivo* els efectes mitogènics d'IGF2 s'han posat de manifest en ratolins transgènics que sobreexpressen el factor de creixement. En illots adults, les accions d'IGF2 com a factor de supervivència s'han determinat en rates alimentades amb una dieta baixa en proteïnes i en un model de trasplantament d'illots encapsulats, en que s'ha mostrat que la incubació dels illots amb IGF2, prèviament al trasplantament, redueix la seva mort. Per tant, IGF2 podria tenir un doble rol beneficiós en la massa beta, actuant sobre les cèl·lules beta pancreàtiques com a factor mitogènic i com a factor de supervivència.

Basant-nos en aquestes evidències, ens plantegem investigar la capacitat d'IGF2 de millorar la supervivència i la proliferació de les cèl·lules beta *in vitro* i *in vivo*, en el trasplantament d'illots.

## **HIPÒTESI DE TREBALL**

La hipòtesis general del projecte és que el pronòstic del trasplantament d'illots pot millorar amb la utilització d'estratègies orientades a incrementar la supervivència i la replicació de les cèl·lules beta. Hipotetitzem que la sobreexpressió d'IGF2 pot millorar el pronòstic del trasplantament d'illots pancreàtics al augmentar la massa beta mitjançant la reducció de l'apoptosi i l'augment de la proliferació de les cèl·lules beta.

## **OBJECTIUS**

L'objectiu general del projecte és determinar si la sobreexpressió d'IGF2 en els illots pancreàtics millora la supervivència i la replicació de les cèl·lules beta pancreàtiques tant *in vitro* com *in vivo*, en el trasplantament d'illots.

Els objectius concrets d'aquest estudi són:

1. Estudiar els efectes de la IL-1 $\beta$  sobre la replicació i la viabilitat de les cèl·lules beta dels illots de rata en cultiu.
2. Estudiar si la sobreexpressió d'IGF2 és capaç de protegir els illots dels efectes deleteris de la IL-1 $\beta$ .
3. Estudiar els efectes de la sobreexpressió de l'IGF2 sobre la viabilitat, la proliferació i la massa de les cèl·lules beta dels illots pancreàtics de rata trasplantats a receptors diabètics.
4. Determinar si la sobreexpressió de l'IGF2 millora el pronòstic del trasplantament d'illots.

**RESULTATS**



**ESTUDI 1:**

**High sensitivity of beta-cell replication to the inhibitory effects of interleukin-1beta:  
modulation by adenoviral overexpression of IGF2 in rat islets.**

**Elisabet Estil·les, Noèlia Téllez, Joan Soler i Eduard Montanya.**

Journal of Endocrinology (2009) 203, 55-63.



## ANTECEDENTS

Està ben establert que la IL-1 $\beta$  indueix la mort cel·lular beta i que el seu efecte citotòxic sobre les cèl·lules beta involucra la inducció d'iNOS i la producció d'òxid nítric (NO). També s'ha descrit, encara que està menys estudiat, que la IL-1 $\beta$  exerceix un efecte inhibitori sobre la replicació de les cèl·lules beta. Per altra banda, els efectes com a mitògens i reguladors del creixement cel·lular dels IGFs han estat àmpliament demostrats. Finalment, la glucosa és el principal regulador de la funció de la cèl·lula beta, la metabolització de la glucosa comporta l'estimulació de la secreció d'insulina, i és ben conegut que la glucosa promou l'augment de la replicació de la cèl·lula beta i que la inducció de la proliferació de les cèl·lules beta estimulada pels IGFs és dependent de les concentracions de glucosa de l'ambient.

## OBJECTIUS

Determinar si la sobreexpressió d'IGF2 és capaç de modificar els efectes deleteris de la IL-1 $\beta$  *in vitro*, disminuir la producció d'òxid nítric, millorant la supervivència i revertint la inhibició de la replicació de les cèl·lules beta induïts per la citocina, així com valorar la influència de la glucosa sobre aquests paràmetres.

## MODEL EXPERIMENTAL

Els estudis dels efectes de la IL-1 $\beta$  i la sobreexpressió d'IGF2 sobre la viabilitat i la proliferació de les cèl·lules beta es van realitzar amb un cultiu primari d'illots de rates Lewis, comparant illots control no infectats i illots que sobreexpressaven IGF2. Els illots es van exposar a diferents concentracions d'IL-1 $\beta$  (0, 1, 10, 30 i 50 U/ml) i es van cultivar a alta (22.2 mM) o baixa (5.5 mM) glucosa. Aquest model ens va permetre estudiar tant els efectes de la IL-1 $\beta$  i l'IGF2 individualment sobre la viabilitat, la funció i la replicació de la cèl·lules beta pancreàtiques, com analitzar conjuntament els seus efectes, així com determinar la influència de les diferents concentracions de glucosa en els diversos paràmetres d'estudi.

## RESULTATS

### Eficiència de la infecció

Per tal de determinar la concentració d'adenovirus més adequada per infectar els illots, és a dir aquella que ens permeti una expressió del gen amb la que obtinguem els efectes esperats sense que es donin els possibles efectes deleteris que porta intrínsecament la infecció amb adenovirus, es van fer infeccions a diferents pfu d'Ad-GFP ( $6.25 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^7$  i  $6.25 \times 10^8$  pfu). Per a les diverses pfu utilitzades després de 48 h de cultiu els illots expressaven GFP a diferents nivells. Per citometria de flux es va determinar que en cada cas un 7.2, 18, 20, 29, 30 i 70% de les cèl·lules expressaven GFP respectivament. En paral·lel a les infeccions amb Ad-GFP es van realitzar infeccions amb un adenovirus que codifica per la luciferasa (Ad-Luc) a les mateixes pfu, per tal de determinar la viabilitat per FDA de les cèl·lules dels illots.

Tant les cèl·lules dels illots control com les infectades amb  $7 \times 10^7$  pfu presentaven una bona eficiència de la infecció i una alta viabilitat, per la qual cosa vam decidir utilitzar  $7 \times 10^7$  pfu d'adenovirus per realitzar les infeccions d'Ad-IGF2.

48 hores després de la infecció el 100% dels illots infectats amb Ad-GFP a  $7 \times 10^7$  pfu expressaven la proteïna exògena en ser observats al microscopi confocal (Fig. 1A). La majoria de les cèl·lules infectades es trobaven a la perifèria dels illots, tal com es va confirmar mitjançant la visualització *in vivo* de illots infectats amb Ad-GFP sota un microscopi confocal (Fig. 1B). L'eficiència de la infecció, determinada a nivell de les cèl·lules individuals dispersades dels illots, per citometria de flux, va ser del 29% (Fig. 2).

### La infecció amb adenovirus no modifica la viabilitat cel·lular ni la funció dels illots

#### **Viabilitat cel·lular dels illots**

La viabilitat dels illots va ser similar en els illots control no infectats i els illots infectats amb Ad-Luc a  $7 \times 10^7$  pfu després de 48 hores de cultiu. En ambdós casos la viabilitat, determinada mitjançant el marcatge de les cèl·lules vives amb diacetat de fluoresceïna (FDA), i el subsegüent anàlisi per citometria de flux va ser d'entre el 90-95%. La tinció amb iodur de propidi (IP), per determinar la mort cel·lular, va donar resultats complementaris, un  $5.61 \pm 0.18\%$  de les cèl·lules

control no infectades, i un  $5.57 \pm 0.18\%$  de les cèl·lules infectades amb Ad-GFP es van tenir per IP (Fig. 2)

### **Funció de les cèl·lules beta dels illots**

Per comprovar si la funció de les cèl·lules beta estava alterada per la infecció amb adenovirus, es va utilitzar com a marcador de funció la secreció d'insulina estimulada per glucosa. Els illots control no infectats i els illots infectats amb Ad-Luc presentaven una secreció d'insulina similar, tant a baixes (2.8 mM), com a altes (16.7 mM) concentracions de glucosa, indicant que la infecció amb adenovirus no tenia efectes sobre la funció beta (Fig. Suplementària 1).

### **Expressió d'IGF2**

Un cop demostrat que la infecció amb adenovirus a les pfu utilitzades ( $7 \times 10^7$ ) no modificava la viabilitat cel·lular dels illots ni la funció de les cèl·lules beta, i que mitjançant adenovirus podíem transferir de forma eficient un gen exogen als illots, vam comprovar que IGF2 estava sobreexpressat en els illots infectats amb Ad-IGF2. 48 hores després de la infecció els illots es van fixar i es confirmar la seva expressió per immunohistoquímica amb un anticòs anti-IGF2 (Fig. 1C).

### **Efectes de la sobreexpressió d'IGF2 sobre la inhibició de la funció $\beta$ induïda per IL-1 $\beta$**

Els ben coneguts efectes inhibitoris de la IL-1 $\beta$  sobre la funció de les cèl·lules beta van ser confirmats en els illots control no infectats exposats a 50 U/ml d'IL-1 $\beta$ , els quals presentaven una profunda inhibició de la secreció de insulina estimulada per glucosa.

En canvi, els illots que sobreexpressaven IGF2 van preservar parcialment la funció de les cèl·lules beta dels illots exposats a 50 U/ml d'IL-1 $\beta$ , en aquest cas presentaven una tendència ( $p=0.077$ ) a l'augment de la secreció d'insulina en resposta a 16.7 mM de glucosa, i un índex d'estimulació que doblava el dels illots control no infectats ( $2.24 \pm 1.69$  vs  $5.45 \pm 0.92$ ) (Fig. Suplementària 2).

### **Efectes de la sobreexpressió d'IGF2 sobre l'apoptosi de les cèl·lules beta induïda per IL-1 $\beta$**

Els illots exposats a les diferents concentracions d'IL-1 $\beta$  (1, 10, 30 i 50 U/ml) durant 48 hores, perdien la seva estructura esfèrica compacta característica i presentaven mides inferiors als illots control no incubats amb la citocina, aquests efectes eren més evidents en els illots cultivats amb les concentracions més elevades de IL-1 $\beta$ .

La IL-1 $\beta$  incrementà l'apoptosi de les cèl·lules beta, determinada per la tècnica del TUNEL, de manera dosi-dependent, tant en els illots cultivats a baixa (5.5 mM) com a alta (22.2 mM) concentració de glucosa (Fig. 3). Els illots cultivats a baixes concentracions de glucosa presentaven un augment significatiu de l'apoptosi quan s'exposaven a 10 U/ml de IL-1 $\beta$ . En els illots cultivats a 22.2 mM de glucosa eren necessàries concentracions d'IL-1 $\beta$  superiors (30 i 50 U/ml) per incrementar l'apoptosi que no es veia modificada per 10 U/ml d'IL-1 $\beta$ .

La sobreexpressió d'IGF2 va protegir de l'apoptosi induïda per IL-1 $\beta$ . En els illots cultivats a 22.2 mM de glucosa i exposats a 50 U/ml, l'apoptosi va ser inferior en els illots Ad-IGF2 que en els illots control no infectats ( $1.62 \pm 0.19$  vs  $0.99 \pm 0.13\%$ ,  $p < 0.03$ ). A més, es van requerir concentracions més altes d'IL-1 $\beta$  per augmentar l'apoptosi en els illots Ad-IGF2 comparat amb els illots no infectats, tant quan es van cultivar a 5.5 mM (Fig. 3A) com a 22.2 mM (Fig. 3B) de glucosa. En els illots cultivats a 5.5 mM de glucosa, 10 U/ml d'IL-1 $\beta$  van ser suficients per incrementar l'apoptosi en els illots control però no en els illots IGF2 que van haver d'exposar-se a 30 U/ml d'IL-1 $\beta$  per presentar una apoptosi incrementada. De forma similar, en els illots cultivats a 22.2 mM de glucosa, la incubació amb 30 U/ml d'IL-1 $\beta$  va produir un augment de l'apoptosi en els illots control no infectats, però no en els illots que sobreexpressaven IGF2, els quals van haver de ser exposats a 50 U/ml d'IL-1 $\beta$  per que es donés un augment de l'apoptosi.

En resum, l'apoptosi de les cèl·lules beta es trobava augmentada després de 48 h d'exposició a 10, 30 i 50 U/ml d'IL-1 $\beta$  de forma dosi-dependent. Aquest efecte pro-apoptòtic provocat per la IL-1 $\beta$  era superior a baixes concentracions de glucosa, per tant, l'alta glucosa va exercir un paper moderadament protector enfront de l'increment de l'apoptosi induït per la IL-1 $\beta$ , tant en els illots control no infectats com en els illots que sobreexpressaven IGF2. Per altra banda, IGF2 exercí un efecte protector, requerint-se concentracions més elevades de la citocina per induir un increment de l'apoptosi en els illots que sobreexpressaven IGF2 en els quals l'efecte deleteri de la IL-1 $\beta$  es va veure reduït.

### **Efectes de la sobreexpressió d'IGF2 sobre la inhibició de la replicació de les cèl·lules beta induïda per IL-1 $\beta$**

La IL-1 $\beta$  va reduir la replicació de les cèl·lules beta dels illots control no infectats exposats a 10, 30 i 50 U/ml, cultivats tant a 5.5 com a 22.2 mM de glucosa (Fig. 4).

La replicació de les cèl·lules beta presentava una elevada sensibilitat a la IL-1 $\beta$ , tal com indica la dràstica reducció que es va donar en els illots exposats a 10 U/ml IL-1 $\beta$  i la completa supressió que es va observar en els illots exposats a 30 i a 50 U/ml d'IL-1 $\beta$ .

A 5.5 mM de glucosa, 1 U/ml d'IL-1 $\beta$  va augmentar la replicació de les cèl·lules beta en comparació amb els illots no infectats no exposats a la citocina. En els illots cultivats a 22.2 mM de glucosa 1 U/ml d'IL-1 $\beta$  no va tenir efectes en la replicació de les cèl·lules beta.

L'exposició a alta glucosa va provocar un increment en la replicació de les cèl·lules beta en els illots no infectats i en els illots que sobreexpressen IGF2 en absència d'IL-1 $\beta$ , així com en els illots exposats a baixes concentracions d'IL-1 $\beta$  (1 i 10 U/ml).

La sobreexpressió d'IGF2 va doblar la replicació de les cèl·lules beta dels illots cultivats a 5.5 i a 22.2 mM de glucosa respecte els illots control no infectats, i va mostrar un efecte protector sobre la replicació de les cèl·lules beta en els illots exposats a 10 U/ml de IL-1 $\beta$ , els quals van mantenir la replicació similar a la dels illots control no infectats no exposats a IL-1 $\beta$ . A les concentracions d'IL-1 $\beta$  més elevades (30 i 50 U/ml), la sobreexpressió d'IGF2 va tenir un impacte mínim sobre la replicació que es va mantenir suprimida tant en els illots cultivats a 5.5 com a 22.2 mM de glucosa.

En resum, la replicació de les cèl·lules beta es trobà fortament inhibida quan els illots s'exposaren a 10, 30 i 50 U/ml d'IL-1 $\beta$ , tant a alta com a baixa glucosa. Per altra banda, la sobreexpressió d'IGF2 augmentà la proliferació beta a ambdues concentracions de glucosa i fou capaç de contrarestar l'efecte inhibitori de la IL-1 $\beta$  sobre la replicació de les cèl·lules beta dels illots exposats a 10U/ml de la citocina, però el seu efecte fou mínim en els illots exposats a les concentracions superiors de la citocina.

### **Producció de nitrits**

La producció de nitrits es va mesurar per tal de determinar si la sobreexpressió d'IGF2 modificava la producció d'òxid nítric induïda per IL-1 $\beta$ . L'acumulació de nitrits (el nitrit és un producte estable de l'oxidació de l'òxid nítric) en el medi de cultiu dels illots, estava incrementada en els illots no infectats exposats a 10 U/ml d'IL-1 $\beta$  durant 48h (Fig. 5), pel contrari no es van observar canvis en l'acumulació de nitrits quan els illots que sobreexpressaven IGF2 es van exposar a IL-1 $\beta$ , indicant que l'IGF2 evita la formació d'òxid nítric en els illots exposats a IL-1 $\beta$ .

### **CONCLUSIONS**

Els nostres resultats indiquen que la replicació de les cèl·lules beta és altament sensible als efectes deleteris de la IL-1 $\beta$ . L'important efecte supressor de la IL-1 $\beta$  sobre la replicació beta pot ser rellevant en el procés que condueix a la pèrdua de massa beta que es dona en la diabetis. La sobreexpressió d'IGF2 en els illots pancreàtics protegeix contra la inhibició de la replicació, la inducció de l'apoptosi i evita la producció d'òxid nítric induïdes per la IL-1 $\beta$ , suggerint que l'IGF2 pot ser útil en el disseny d'estratègies dirigides a mantenir o regenerar de la massa beta en la diabetis o en el trasplantament d'illots pancreàtics.

# High sensitivity of $\beta$ -cell replication to the inhibitory effects of interleukin-1 $\beta$ : modulation by adenoviral overexpression of IGF2 in rat islets

Elisabet Estil-les<sup>1</sup>, Noèlia Téllez<sup>1,2</sup>, Joan Soler<sup>1,2,3</sup> and Eduard Montanya<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Diabetes and Experimental Endocrinology, Department of Clinical Sciences, IDIBELL-University of Barcelona, Feixa Llarga s/n 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), 08036 Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Endocrine Unit (13-2), IDIBELL-Hospital Universitari Bellvitge, Feixa Llarga, s/n 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

(Correspondence should be addressed to E Montanya at Endocrine Unit (13-2), IDIBELL-Hospital Universitari Bellvitge; Email: montanya@ub.edu)

## Abstract

Interleukin-1 $\beta$  (IL1B) is an important contributor to the autoimmune destruction of  $\beta$ -cells in type 1 diabetes, and it has been recently related to the development of type 2 diabetes. IGF2 stimulates  $\beta$ -cell proliferation and survival. We have determined the effect of IL1B on  $\beta$ -cell replication, and the potential modulation by IGF2 and glucose. Control-uninfected and adenovirus encoding for IGF2 (Ad-IGF2)-infected rat islets were cultured at 5.5 or 22.2 mmol/l glucose with or without 1, 10, 30, and 50 U/ml of IL1B.  $\beta$ -Cell replication was markedly reduced by 10 U/ml of IL1B and was almost nullified with 30 or 50 U/ml of IL1B. Higher concentrations of IL1B were required to increase  $\beta$ -cell apoptosis. Although IGF2 overexpression had a strong mitogenic effect on  $\beta$ -cells, IGF2 could preserve  $\beta$ -cell proliferation only in islets cultured with 10 U/ml IL1B, and

had no effect with 30 and 50 U/ml of IL1B. In contrast, IGF2 overexpression induced a clear protection against IL1B-induced apoptosis, and higher concentrations of the cytokine were needed to increase  $\beta$ -cell apoptosis in Ad-IGF2-infected islets. These results indicate that  $\beta$ -cell replication is highly sensitive to the deleterious effects of the IL1B as shown by the inhibition of replication by relatively low IL1B concentrations, and the almost complete suppression of  $\beta$ -cell replication with high IL1B concentrations. Likewise, the inhibitory effects of IL- $\beta$  on  $\beta$ -cell replication were not modified by glucose, and were only modestly prevented by IGF2 overexpression, in contrast with the higher protection against IL1B-induced apoptosis afforded by glucose and by IGF2 overexpression.

*Journal of Endocrinology* (2009) **203**, 55–63

## Introduction

$\beta$ -Cell mass reduction has a central role in the development of type 1 and type 2 diabetes, and in both conditions the loss of  $\beta$ -cells has been largely attributed to increased  $\beta$ -cell death (Butler *et al.* 2003, Devendra *et al.* 2004). Recent reports have highlighted the fundamental contribution of  $\beta$ -cell replication to the physiological maintenance of  $\beta$ -cell mass (Montanya *et al.* 2000, Meier *et al.* 2008), and to  $\beta$ -cell mass regeneration in models with reduced  $\beta$ -cell mass (Dor *et al.* 2004, Nir *et al.* 2007). This may suggest that impaired  $\beta$ -cell replication could contribute to the reduction of  $\beta$ -cell mass in diabetes.

Interleukin-1 $\beta$  (IL1B) is an important contributor to  $\beta$ -cell damage in type 1 diabetes (Mandrup-Poulsen 1996), and recently it has also been related to the development of type 2 diabetes (Larsen *et al.* 2007). It is well established that IL1B, alone or in combination with other pro-inflammatory cytokines interferon- $\gamma$  (IFNG) and tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF), induces  $\beta$ -cell death in mouse, rat, and human islets

(Saldeen 2000, Eizirik & Mandrup-Poulsen 2001, Mathis *et al.* 2001). IL1B exerts also an inhibitory effect on  $\beta$ -cell replication (Eizirik *et al.* 1990, Southern *et al.* 1990, Sjöholm 1991, Maedler *et al.* 2001, Téllez *et al.* 2005), that has received less attention and is less well defined. In an islet transplantation model, we recently reported that islet overexpression of the IL-1 naturally occurring antagonist, IL-1 receptor antagonist protein, increased  $\beta$ -cell replication and mass (Téllez *et al.* 2007), suggesting that IL1B inhibition of  $\beta$ -replication was relevant in  $\beta$ -cell mass reduction. Thus, IL1B could play a dual role in  $\beta$ -cell mass reduction inducing  $\beta$ -cell death and inhibiting  $\beta$ -cell replication.

Insulin-like growth factors I and II (IGF1 and IGF2) are potent  $\beta$ -cell growth factors (Vasavada *et al.* 2006). *In vitro*, IGF1 and IGF2 promote DNA synthesis in  $\beta$ -cell lines, and in rat and human fetal  $\beta$ -cells (Hogg *et al.* 1993, Asfari *et al.* 1995, Huotari *et al.* 1998). *In vivo*, the mitogenic effect of IGF2 was shown in transgenic mice overexpressing *Igf2* gene (Petrik *et al.* 1999a). IGF1 and -2 can also increase  $\beta$ -cell survival. In early neonatal life there is a wave of apoptotic

$\beta$ -cell death (Scaglia *et al.* 1997) that has been linked to the concomitant reduction in IGF2 expression (Petrik *et al.* 1998, Hill *et al.* 2000). In adult islets, IGF2 survival action has been shown in rats fed with a low protein diet (Petrik *et al.* 1999b), and in transplanted islets (Robitaille *et al.* 2003). Thus, IGF2 may play a dual beneficial role on  $\beta$ -cell mass, acting both as a mitogenic and as a survival factor for  $\beta$ -cells. Cytokines inhibit the expression of IGFs in several cell types (Ilvemarski *et al.* 1993, Martin *et al.* 1993, Lin *et al.* 1994), and a reduction in IGF2 immunoreactivity has been found in islet cells undergoing insulinitis, suggesting that cytokines may inhibit the expression of IGF2 in islet cells (Hill *et al.* 1999). Although IGF2 may protect islet cells from cytokine-induced apoptosis (Hill *et al.* 1999), some studies have shown no effect of IGFs on IL1B-induced apoptosis (Raile *et al.* 2003), and it is not known whether IGF2 could modify IL1B-induced suppression of  $\beta$ -cell replication. In this study we aimed to investigate the effect of IL1B on  $\beta$ -cell replication, and the potential modulation by IGF2. Since the induction of  $\beta$ -cell proliferation by IGFs is dependent on ambient glucose concentration (Hügl *et al.* 1998), low and high glucose concentrations were used to better define the effects of IL1B and IGF2 on  $\beta$ -cell replication.

## Material and Methods

### Islet isolation

Islets from male LEW/SsNHsd rats (Harlan, Horst, The Netherlands; 6–8 weeks old, 175–200 g of body weight) were isolated by collagenase (Collagenase P; Roche Diagnostics) digestion of the entire pancreas as previously described (Nácher *et al.* 1996). Isolated islets were hand-picked under a stereomicroscope two or three times, until a population of pure islets was obtained. Islets were washed in serum-free RPMI 1640 11.1 mmol/l glucose (Sigma Immunochemicals) supplemented with 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin before infection. Each experiment was performed using a pool of 1000–1200 islets obtained from four rats in a single isolation procedure. The islets of the pool were then randomly distributed among the different experimental conditions studied in each experiment. Each condition was studied in 3–11 different experiments, as indicated in figure legends.

### Recombinant adenoviruses

E1–E3-deleted adenoviral vectors were used for islet transfection. Adenovirus encoding for green fluorescent protein (Ad-GFP) was used to assess the efficiency of infection, and adenovirus encoding for luciferase (Ad-Luc) as control of infection. Ad-GFP, Ad-Luc, and adenovirus encoding for IGF2 (Ad-IGF2) were generated by Pacific Northwest Research Institute (Seattle, USA). In all adenoviral vectors the transgene was driven by the cytomegalovirus (CMV) promoter.

### Gene transfer

Groups of 200 islets were left uninfected (uninfected control group), or infected with Ad-Luc, Ad-GFP, or Ad-IGF2 at a plaque-forming unit of  $7 \times 10^7$  in 400  $\mu$ l serum-free RPMI 1640 11.1 mmol/l glucose for 2 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After infection, islets were washed three times in RPMI 1640 containing 10% heat-inactivated FCS, and incubated overnight in non-tissue culture-treated plasticware at 37 °C in serum containing medium at 11.1 mmol/l of D-glucose.

### Islet culture

After overnight incubation, islets were cultured in RPMI 1640 10% FCS, 11.1 mmol/l glucose for 48 h to determine the efficiency of infection, islet viability, and islet function. To determine the effects of IL1B on  $\beta$ -cell apoptosis and replication, and the modulation by IGF2 overexpression and glucose, control-uninfected islets and Ad-IGF2-infected islets were cultured for 48 h in RPMI 1640 10% FCS at 5.5 and 22.2 mmol/l D-glucose with or without 1, 10, 30, and 50 U/ml recombinant human IL1B (BD Pharmingen, Heidelberg, Germany).

### Efficiency of infection

The efficiency of infection was determined by flow cytometry, confocal microscopy, and immunohistochemical confirmation of IGF2 overexpression 48 h after adenoviral infection.

**Flow cytometry** Forty-eight hours after infection, Ad-GFP-infected islets were dispersed into single cells and analyzed on a FACS caliber cytometer (Beckton Dickinson Instruments, Heidelberg, Germany) using 488 nm excitation and a  $530 \pm 15$  nm band-pass filter, as previously described (Téllez *et al.* 2005).

**Confocal microscopy** *In vivo* observation of whole Ad-GFP-infected islets with a confocal microscope (Leica TC6-SL Spectral confocal; Mannheim, Germany) was used to determine the distribution of infected islet cells.

**IGF2 expression** Cultured islets were fixed overnight in 4% paraformaldehyde at 4 °C, embedded in paraffin, sectioned and immunostained after deparaffinization and rehydration. Sections were incubated overnight at 4 °C with a rabbit anti-human IGF2 antibody (final dilution 1:100; Novozymes GroPep, Adelaide, Australia). Visualization was performed with LSAB + System-HRP (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA).

### Islet cell viability

To assess islet cell viability after adenovirus infection, fluorescein diacetate (FDA; Sigma) assay was used (Persidsky & Baillie 1977). After 48 h culture, Ad-Luc-infected islets

were dispersed into single cells, incubated with FDA (4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 10 min, and analyzed on the flow cytometer at 488 nm excitation and a 530  $\pm$  15 nm band-pass filter for FDA detection (green).

Propidium iodide (PI) was used to determine islet cell late apoptosis and necrosis. After 48 h culture, Ad-GFP-infected islets were dispersed into single cells and immediately before cytometric analysis, 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI (Sigma) was added. PI fluorescence emission was collected at 620 nm (red).

#### Insulin secretion

Glucose-stimulated insulin secretion was used as a functional assay to determine the effects of adenoviral infection. Control-uninfected islets and Ad-Luc-infected islets were cultured for 48 h with RPMI 1640 medium supplemented with 11.1 mmol/l glucose and 10% FCS. Control-uninfected islets and Ad-IGF2-infected islets were also cultured for 48 h in RPMI 1640 10% FCS at 11.1 mmol/l D-glucose with or without 50 U/ml recombinant human IL1B to determine the effects of IL1B and IGF2 overexpression on  $\beta$ -cell function. Cultured islets were then washed twice with Krebs–Ringer bicarbonate buffer supplemented with HEPES and BSA (KRBH buffer: 115 mmol/l NaCl; 24 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>; 5 mmol/l KCl; 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub>; 2.5 mmol/l CaCl<sub>2</sub>; 10 mmol/l HEPES; and 0.5% BSA, pH 7.4) with 2.8 mmol/l glucose, and were pre-incubated 1 h at 37 °C in triplicate groups of 10 islets in 1 ml fresh KRBH buffer containing 2.8 mmol/l glucose. The medium was removed and islets were incubated with 1 ml of KRBH buffer containing 2.8 or 16.7 mmol/l glucose for an additional hour with continuous shaking. Supernatants were removed and stored at –80 °C until assayed for insulin content. Insulin was measured by ELISA (Mercodia Rat insulin ELISA, Mercodia AB, Uppsala, Sweden).

#### DNA content

After the insulin secretion assay, islets were rinsed three times with phosphate buffer (2 M NaCl; 40 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; 2 mmol/l EDTA) to avoid the interfering effect of BSA in the DNA test and were disrupted by sonication. DNA was determined by a fluorimetric assay using Hoechst 33258 (Sigma; excitation wave length 356 nm, and emission wave length 448 nm) on a fluorescence spectrophotometer (F-2000, Hitachi Ltd, Tokyo, Japan).

#### Immunocytochemical quantification of $\beta$ -cell apoptosis and replication

Cultured islets were fixed overnight in 4% paraformaldehyde at 4 °C, embedded in paraffin, sectioned and immunostained after deparaffinization and rehydration.

**$\beta$ -Cell apoptosis** Sections were double stained by immunoperoxidase for apoptotic nuclei with the terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling

(TUNEL) technique (*In Situ* Cell Death Detection Kit, ApopTag, Intergene, Oxford, UK) and by alkaline phosphatase for the endocrine non- $\beta$ -cells of the islets. A cocktail of antibodies (Dako) rabbit anti-swine glucagon (final dilution 1:1000), rabbit anti-human somatostatin (final dilution 1:1000), and rabbit anti-human pancreatic polypeptide (final dilution 1:500) were used as previously described (Biarnés *et al.* 2002). After immunoperoxidase staining,  $\beta$ -cells and TUNEL positive  $\beta$ -cells were counted using an Olympus BX microscope connected to a digital camera Olympus DP70 with a color monitor (Téllez *et al.* 2005). When assessing apoptotic nuclei we excluded necrotic regions.  $\beta$ -Cell apoptosis was expressed as percentage of TUNEL-positive  $\beta$ -cells. A minimum of 1200 cells per sample were counted; the sections were systematically sampled, all endocrine nuclei were counted, and when needed a second section was included.

**$\beta$ -Cell replication** The thymidine analog 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Amersham) was added to the islet culture for the last 24 h of culture prior to fixation. Sections were double stained with immunoperoxidase for BrdU using a Cell Proliferation Kit (Amersham) with a modified protocol (Biarnés *et al.* 2002), and for endocrine non- $\beta$ -cells of the islets using the cocktail of antibodies described above. After immunoperoxidase staining,  $\beta$ -cells and BrdU-positive  $\beta$ -cells were counted as described for  $\beta$ -cell apoptosis.  $\beta$ -Cell replication was expressed as percentage of BrdU-positive  $\beta$ -cells, and at least 1200 cells were counted.

#### Nitrite determination

Nitric oxide (NO) production by islets was measured as nitrite accumulation in culture media (nitrite is a stable product of NO oxidation). Groups of 100 control-uninfected and Ad-IGF2-infected islets were cultured for 48 h in RPMI 1640 medium without phenol red supplemented with 11.1 mmol/l glucose and 5% FCS with or without 10 U/ml of recombinant human IL1B. Samples of the conditioned media were collected and nitrite was measured by nitrate/nitrite fluorometric assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

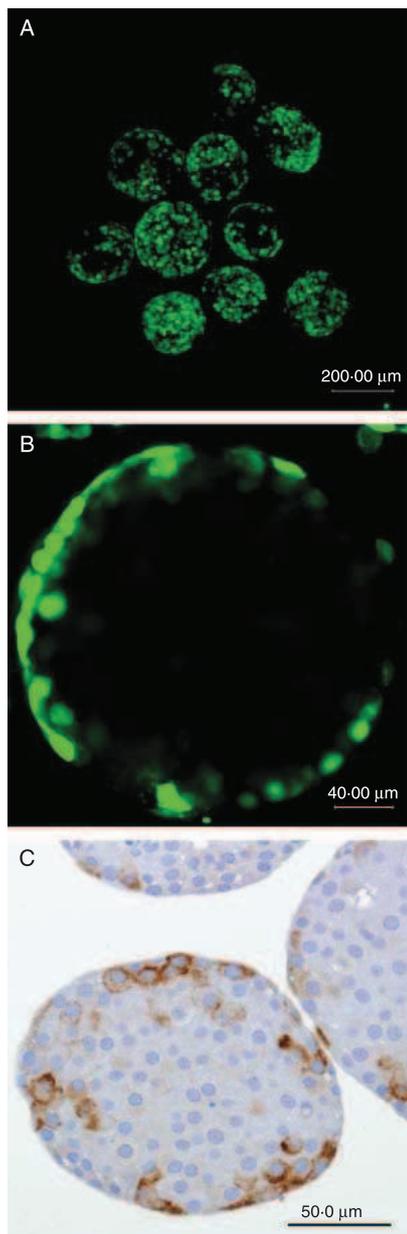
#### Statistical analysis

Results were expressed as means  $\pm$  S.E.M. Statistics were performed using SPSS 12.0 (Chicago, IL, USA) for windows, and differences among means were evaluated by the Kruskal–Wallis test, followed by the Mann–Whitney test. A *P* value of <0.05 was considered significant.

## Results

#### Efficiency of infection

Forty-eight hours after gene transfer 100% of Ad-GFP-infected islets expressed GFP when observed by confocal microscopy (Fig. 1A). The majority of infected cells were in



**Figure 1** Efficiency of adenovirus islet infection analyzed by confocal microscopy and immunocytochemistry 48 h after infection. Ad-GFP-infected islets visualized by confocal microscopy showing GFP positive cells (green). The image is a 2D average projection of a series along fixed axis (A). Infected cells were predominantly found in the periphery of the islets, as visualized by confocal microscopy in Ad-GFP-infected islets (green) (B), and in Ad-IGF2-infected islets stained with an anti-IGF2 antibody (brown) (C).

the periphery of the islets (Fig. 1B). The predominantly peripheral expression of IGF2 protein by Ad-IGF2-infected islets was confirmed by immunocytochemical staining with an anti-IGF2 antibody (Fig. 1C). When the efficiency of infection was determined at the level of individual islet cells by flow cytometry of dispersed islet cells, it was found that 29% of islet cells were infected (Fig. 2).

#### *Adenoviral infection did not modify islet viability and function*

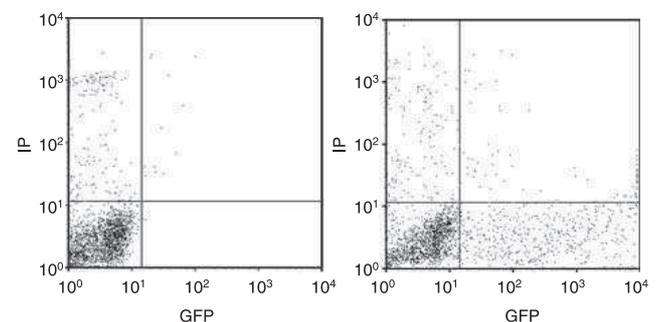
Islet viability was similar in control-uninfected and in Ad-Luc-infected islets. In both cases, FDA staining showed 90–95% viability after 48 h in culture (data not shown). PI staining yielded similar results, and only  $5.61 \pm 0.54\%$  of control-uninfected and  $5.57 \pm 0.18\%$  of Ad-GFP-infected islets cells were found to be stained by PI (Fig. 2). Glucose-stimulated insulin secretion was also similar in Ad-Luc-infected and control-uninfected islets (Supplementary Fig. 1, available in the online version of the Journal of Endocrinology at <http://joe.endocrinology-journals.org/cgi/content/full/JOE-09-0047/DC1>), indicating that adenoviral infection had no effect on  $\beta$ -cell function.

#### *Effects of IGF2 overexpression on IL1B-induced inhibition of $\beta$ -cell-function*

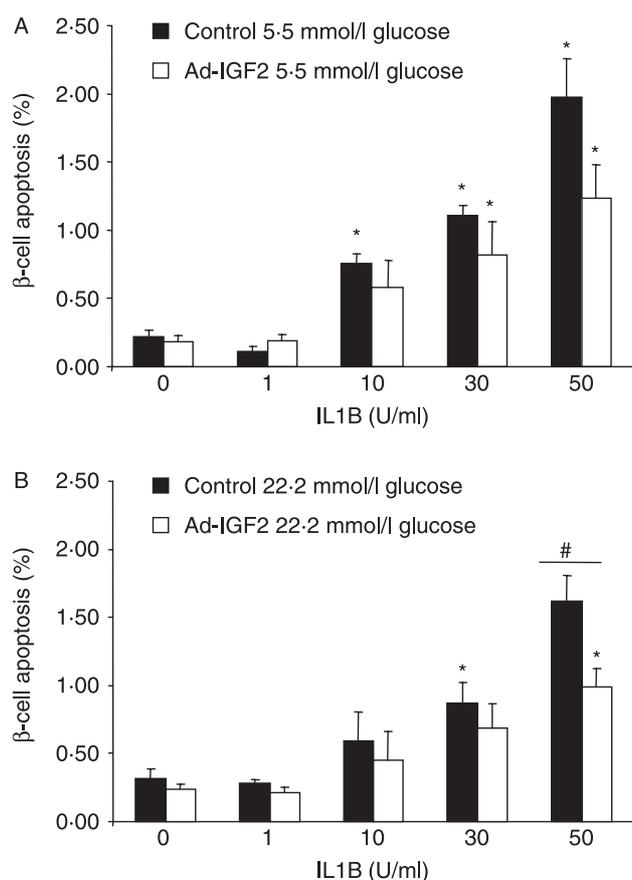
The well-established inhibitory effects of IL1B on  $\beta$ -cell function were confirmed in control-uninfected islets incubated with IL1B that showed a profoundly impaired glucose stimulated insulin secretion. IGF2 overexpression partly preserved  $\beta$ -cell function in islets exposed to 50 U/ml of IL1B that showed an increased insulin secretion in response to 16.7 mmol/l glucose of borderline statistical significance ( $P=0.077$ ), and an insulin stimulation index that doubled that of control-uninfected islets ( $2.24 \pm 1.69$  vs  $5.45 \pm 0.92$ ; Supplementary Fig. 2, available in the online version of the Journal of Endocrinology at <http://joe.endocrinology-journals.org/cgi/content/full/JOE-09-0047/DC1>).

#### *Effects of IGF2 overexpression on IL1B-induced $\beta$ -cell apoptosis*

IL1B increased  $\beta$ -cell apoptosis in a dose-dependent manner in islets cultured at low (5.5 mmol/l) and at high (22.2 mmol/l) glucose concentration (Fig. 3).  $\beta$ -Cell apoptosis was higher in



**Figure 2** Efficiency of adenovirus islet infection and islet cell viability analyzed by flow cytometry 48 h after infection. Dispersed islet cells of control-uninfected islets (left dot-plot) and Ad-GFP-infected islets (right dot-plot) were analyzed by flow cytometry for GFP production and propidium iodide (PI) staining. 29% of individual cells from Ad-GFP-infected islets showed GFP expression, and only 5.6% of both control-uninfected and Ad-GFP-infected islets were stained by PI.



**Figure 3** Effect of IL1B and IGF2 overexpression on  $\beta$ -cell apoptosis. Control-uninfected and Ad-IGF2-infected islets were exposed to 0, 1, 10, 30 and 50 U/ml of IL1B, at 5.5 (A) or 22.2 (B) mmol/l glucose for 48 h to study the effect of IL1B and of IGF2 overexpression on  $\beta$ -cell apoptosis. Values are means  $\pm$  s.e.m. ( $n=9-11$  for control-uninfected and Ad-IGF2-infected islets not exposed to IL1B, and  $n=5$  for all other groups). Kruskal-Wallis,  $P<0.001$  among all groups cultured at 5.5 mmol/l glucose (A), or among all groups cultured at 22.2 mmol/l glucose (B). Mann-Whitney \* $P<0.01$  versus control-uninfected group not exposed to IL1B; # $P<0.05$  between control-uninfected islets and IGF2-infected islets cultured with 50 U/ml IL1B.

islets cultured at low glucose concentration that showed increased apoptosis when exposed to 10 U/ml or higher concentrations of IL1B. In islets cultured at 22.2 mmol/l glucose, higher concentrations of IL1B (30 and 50 U/ml) were required to increase  $\beta$ -cell apoptosis that was not modified by 10 U/ml of IL1B.

IGF2 overexpression protected  $\beta$ -cells against IL1B-induced apoptosis. In islets cultured at 22.2 mmol/l glucose and exposed to 50 U/ml of IL1B,  $\beta$ -cell apoptosis was lower in Ad-IGF2 islets than in control-uninfected islets ( $1.62 \pm 0.19$  vs  $0.99 \pm 0.13\%$ ,  $P<0.03$ ). Moreover, a higher concentration of IL1B was required to increase  $\beta$ -cell apoptosis in Ad-IGF2-infected islets compared to control-uninfected islets, both in islets incubated at low (Fig. 3A) and at high glucose (Fig. 3B). In islets cultured at 5.5 mmol/l glucose, 10 U/ml of IL1B were sufficient to increase  $\beta$ -cell

apoptosis in control islets but not in Ad-IGF2 islets that had to be exposed to 30 U/ml IL1B. Similarly, in islets cultured at 22.2 mmol/l glucose, incubation with 30 U/ml IL1B increased  $\beta$ -cell apoptosis in uninfected islets but not in Ad-IGF2 islets that had to be exposed to 50 U/ml IL1B. Thus, the IL1B pro-apoptotic effect on  $\beta$ -cells was higher at low glucose concentrations, and was reduced in islets overexpressing IGF2.

#### Effects of IGF2 overexpression on IL1B-induced inhibition of $\beta$ -cell replication

IL1B reduced  $\beta$ -cell replication in islets exposed to 10, 30, and 50 U/ml, both at low and high glucose concentrations (Fig. 4).  $\beta$ -Cell replication showed a high sensitivity to IL1B as indicated by the dramatic reduction in islets exposed to 10 U/ml IL1B and the almost complete suppression with 30 and 50 U/ml of IL1B.

At 5.5 mmol/l glucose, 1 U/ml IL1B increased  $\beta$ -cell replication compared with uninfected islets not exposed to IL1B. No effect of 1 U/ml IL1B was detected in islets cultured at 22 mmol/l glucose. Glucose increased  $\beta$ -cell replication in uninfected and in Ad-IGF2 islets in the absence of IL1B and in islets exposed to low (1 and 10 U/ml) IL1B concentrations.

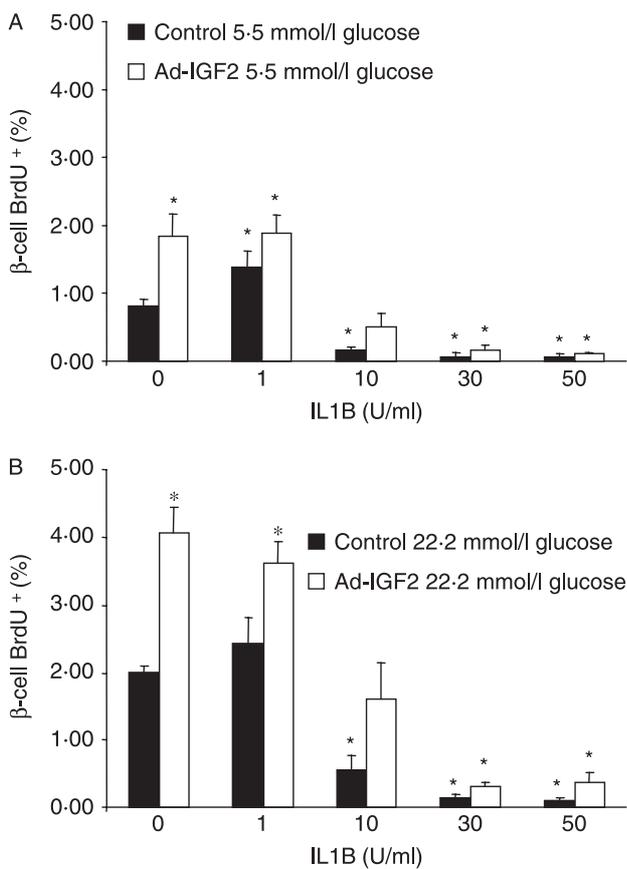
IGF2 overexpression doubled  $\beta$ -cell replication in islets cultured at 5.5 and at 22.2 mmol/l glucose compared with control-uninfected islets, and showed a protective effect on  $\beta$ -cell replication in islets exposed to 10 U/ml IL1B that maintained  $\beta$ -cell replication similar to that of control-uninfected islets not exposed to IL1B. At higher IL1B concentrations (30 and 50 U/ml), IGF2 overexpression had minimal impact on  $\beta$ -cell replication that remained almost completely suppressed both in islets cultured at 5.5 and 22.2 mmol/l glucose.

#### Nitrite production

Nitrite production was measured to determine whether IGF2 overexpression modified IL1B-induced production of NO. Nitrite accumulation in cell culture supernatants was increased in control-uninfected islets exposed to 10 U/ml of IL1B for 48 h (Fig. 5). In contrast, no changes in nitrite accumulation were detected when islets overexpressing IGF2 were exposed to IL1B, indicating that IGF2 prevented the formation of NO in islets exposed to IL1B.

#### Discussion

In this study, we show that IL1B has a profound inhibitory effect on  $\beta$ -cell replication that was partly prevented by adenoviral overexpression of IGF2 on islet cells. The high sensitivity of  $\beta$ -cell replication to IL1B was established based on the almost complete suppression of  $\beta$ -cell replication, the absence of modulation by glucose, and the relatively



**Figure 4** Effect of IL1B and IGF2 overexpression on  $\beta$ -cell replication. Control-uninfected and Ad-IGF2-infected islets were exposed to 0, 1, 10, 30, and 50 U/ml of IL1B, at 5.5 (A) or 22.2 (B) mmol/l glucose for 48 h to study the effect of IL1B and of IGF2 overexpression on  $\beta$ -cell and replication. Values are means  $\pm$  S.E.M. ( $n=9-11$  for control-uninfected and IGF2-infected islets not exposed to IL1B, and  $n=5$  for all other groups). Kruskal–Wallis,  $P<0.001$  among all groups cultured at 5.5 mmol/l glucose (A) or among all groups cultured at 22.2 mmol/l glucose (B). Mann–Whitney,  $*P<0.05$  versus control-uninfected group not exposed to IL1B.

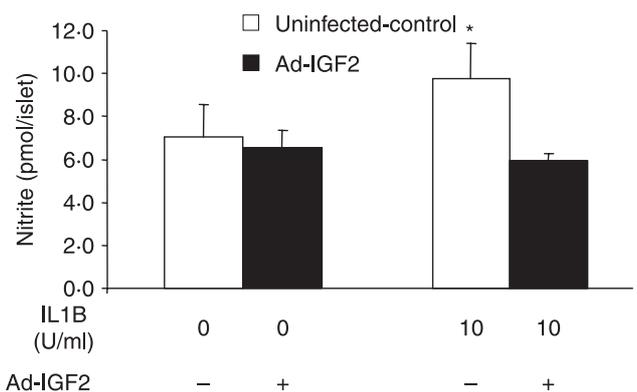
modest prevention achieved by IGF2 overexpression compared with the higher protection afforded by glucose and IGF2 on IL1B-induced apoptosis.

$\beta$ -Cell replication was increased in islets exposed to very low IL1B (1 U/ml) concentration and was severely reduced with higher amounts of IL1B. The mitogenic effect of very low IL1B concentrations is in agreement with the results reported in human islets, a beneficial action that could reflect a physiological role of low cytokine concentrations on islet cells (Maedler *et al.* 2006). In contrast, higher IL1B concentrations had a clear deleterious effect, and induced a strong inhibition of  $\beta$ -cell replication. The suppression of  $\beta$ -cell replication was detected with IL1B concentrations that were insufficient to induce  $\beta$ -cell apoptosis, indicating a high sensibility of  $\beta$ -cell replication to IL1B.  $\beta$ -Cell replication was substantially reduced in rat islets exposed to 10 U/ml IL1B, and was almost completely suppressed in

islets exposed to 30 and 50 U/ml of IL1B. In contrast, 30 and 50 U/ml of IL1B was required to consistently increase  $\beta$ -cell apoptosis.

The strong suppression of  $\beta$ -cell replication by IL1B was also found in islets overexpressing IGF2. In the absence of IL1B, IGF2 overexpression increased  $\beta$ -cell replication in islets cultured at low and high glucose concentration in agreement with the well-known mitogenic effects of IGF2 (Hogg *et al.* 1993, Asfari *et al.* 1995, Petrik *et al.* 1999a). In islets exposed to IL1B, IGF2 overexpression had a clear anti-apoptotic action, but resulted in a more modest preservation of  $\beta$ -cell replication. IGF2 overexpression reduced  $\beta$ -cell apoptosis, but preserved  $\beta$ -cell replication only in islets exposed to 10 U/ml IL1B, and had no effects on the suppressed  $\beta$ -cell replication of islets exposed to 30 or 50 U/ml IL1B. Overall, the results indicate that  $\beta$ -cell replication is more sensitive to the deleterious effects of IL1B than  $\beta$ -cell survival.

The effects of glucose on  $\beta$ -cell survival are modified by glucose concentration, duration of exposure, and genetic background. *In vitro*, glucose has been found to promote the survival of rat single  $\beta$ -cells (Hoorens *et al.* 1996), but also to induce apoptosis in islets of diabetic-prone animals (Donath *et al.* 1999), and in human islets (Maedler *et al.* 2001). *In vivo*, we have reported increased  $\beta$ -cell apoptosis in transplanted mice islets exposed to chronic hyperglycemia (Biarnés *et al.* 2002). The effects of glucose on IL1B-induced apoptosis are not well established, and although high glucose concentrations amplified cell damage in islets exposed to IL1B (Spinas *et al.* 1988), other studies reported no effects of glucose on IL1B-induced  $\beta$ -cell apoptosis (Raile *et al.* 2003, Téllez *et al.* 2005). In the current study, the use of several IL1B concentrations allowed us to identify the protective action of glucose on IL1B-induced apoptosis. In the absence of IL1B,  $\beta$ -cell apoptosis was similar in islets incubated at low



**Figure 5** Effects of IL1B and IGF2 overexpression on islet cell production of nitric oxide. Control-uninfected islets and Ad-IGF2-infected islets were incubated for 48 h in the presence or absence of 10 U/ml of IL1B. Nitrite production is expressed as pmol of nitrite/islet every 48 h. Values are means  $\pm$  S.E.M. ( $n=4$ )  $*P<0.05$  between control islets exposed to 10 U/ml IL1B and Ad-IGF2 islets exposed to 10 U/ml IL1B.

and high glucose concentration. However, when islets were exposed to 10 U/ml IL1B,  $\beta$ -cell apoptosis was increased in islets cultured at low (5.5 mmol/l), but not at high (22.2 mmol/l) glucose, suggesting that glucose had a pro-survival effect. This protective effect of glucose was confirmed in islets overexpressing IGF2 and exposed to 30 U/ml IL1B that showed increased  $\beta$ -cell apoptosis only when cultured at low glucose. In contrast, despite the strong and well established proliferative effect of glucose on  $\beta$ -cells (Svenne 1982, Lingohr *et al.* 2006) glucose did not modulate the inhibitory effect of IL1B on  $\beta$ -cell replication, an additional indication of the high sensitivity of  $\beta$ -cell replication to the deleterious effects of IL1B.

Several of the deleterious effects of IL1B on rodent islets are mediated by NO (Darville & Eizirik 1998) which is produced by the inducible form of NO synthase (iNOS). We found that in islets exposed to IL1B, NO production was lower in islets overexpressing IGF2 than in control-uninfected islets, suggesting that the protection afforded by IGF2 was mediated in part by the inhibition of iNOS expression. These results are in agreement with the observation that the neonatal peak of islet apoptosis coincides with low IGF2 and with increased iNOS levels, suggesting that IGF2 has an inhibitory effect on NO formation (Petrik *et al.* 1998). Furthermore, signaling by IGF1 involves the activation of IGF1 receptor, and IGF1 has been shown to decrease IL1B-mediated NO formation by inhibition of iNOS expression and synthesis in rodent islets (Mabley *et al.* 1997, Castrillo *et al.* 2000), and to prevent IL1B-mediated NO production in human islets, as well as  $\beta$ -cell dysfunction and apoptosis (Giannoukakis *et al.* 2000).

The inhibitory effect of IL1B on  $\beta$ -cell secretion are well established and have been studied in detail (Eizirik *et al.* 1988, Scarim *et al.* 1997). Our experiments have confirmed the profound impairment of  $\beta$ -cell function induced by IL1B, and we found a limited protection in islets infected with Ad-IGF2. Some studies have shown a role for insulin in adult  $\beta$ -cell replication and  $\beta$ -cell mass maintenance (Okada *et al.* 2007). In our experiments, although IGF2 overexpression partly preserved insulin secretion in islets exposed to high IL1B,  $\beta$ -cell replication remained fully suppressed, indicating that the secreted insulin was not sufficient to increase  $\beta$ -cell proliferation.

The high sensitivity of  $\beta$ -cell replication to IL1B may be relevant for the reduction of  $\beta$ -cell mass which takes place in diabetes. In normal conditions,  $\beta$ -cell mass is maintained by a balance between cell regeneration and death, and recent data have shown that  $\beta$ -cells have a strong potential for regeneration that can compensate severe reductions in  $\beta$ -cell mass (Dor *et al.* 2004, Nir *et al.* 2007), even though  $\beta$ -cell growth potential could be more limited in human islets (Parnaud *et al.* 2008). IL1B-induced  $\beta$ -cell damage has been implicated in the pathogenesis of type 1 diabetes and more recently in type 2 diabetes, essentially based on the suppressive effects of IL1B on  $\beta$ -cell function and on the induction of  $\beta$ -cell death. The strong inhibitory effect of IL1B on  $\beta$ -cell

replication that we show suggests that impaired  $\beta$ -cell replication may be important in the demise of  $\beta$ -cells in diabetes. The suppression of  $\beta$ -cell replication could abrogate the replicative response needed to compensate the reduction of  $\beta$ -cell mass induced by increased  $\beta$ -cell death. The recent indication that  $\beta$ -cell replication is not increased in recent-onset type 1 diabetic patients could support this hypothesis (Butler *et al.* 2007). By suppressing  $\beta$ -cell replication IL1B could prevent the renewal of  $\beta$ -cells and reduce  $\beta$ -cell mass even in the absence of increased  $\beta$ -cell apoptosis.

Adenoviral overexpression is a useful technique to assess the effects achieved by the local and transient administration of proteins with potential therapeutic action. This is of particular interest in islet transplantation, where the expression in the graft of proteins with therapeutic action could obtain the beneficial effect and avoid the unwanted toxicity associated with systemic administration. The beneficial effects of adenoviral overexpression of IGF2 that we have found *in vitro* provide the bases to tests these effects in *in vivo* in experimental islet transplantation, a condition where increased levels of IL1B in the graft in the initial days after transplantation are thought to play a deleterious role in the survival of transplanted  $\beta$ -cells (Montolio *et al.* 2007). The predominantly peripheral expression of IGF2 in islet cells suggests that the majority of infected cells were endocrine non- $\beta$  cells, most of them  $\alpha$ -cells. However, since IGF2 is secreted, it was active on more cells than just the islet cells infected by the adenovirus, and exerted a paracrine effect on neighboring cells as indicated by the substantial effects found on  $\beta$ -cells. The different distribution of endocrine cell types in rodent and human islets, where  $\alpha$ -cells and  $\beta$ -cells are scattered throughout the islet, could increase the number of infected  $\beta$ -cells in human islets. However, the paracrine effect of secreted IGF2 reduces the significance of the specific endocrine cell type that becomes infected by the adenovirus.

In summary, our results indicate that  $\beta$ -cell replication is highly sensitive to the deleterious effect of IL1B. The strong suppressive effect of IL1B on  $\beta$ -cell replication may be relevant for the process leading to the loss of  $\beta$ -cell mass in diabetes. Adenoviral transfer of IGF2 to islets protected against IL1B inhibition of  $\beta$ -cell replication and IL1B-induced  $\beta$ -cell apoptosis, and prevented IL1B-induced NO production, suggesting that IGF2 could have a role in strategies to induce the regeneration of  $\beta$ -cell mass in diabetes or in islet transplantation.

#### Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of this scientific work.

#### Funding

This work was supported by grants from the Juvenile Diabetes Foundation International (1-2002-687), FIS 03/0047 and FIS 06/0891, and the Instituto

de Salud Carlos III (ISCIII) RCMN (C03/08). CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM) is a project of ISCIII. Elisabet Estil·les was supported by a grant from Fundació Privada IDIBELL.

## Acknowledgements

We thank Jessica Escoriza for skillful technical assistance.

## References

- Asfari M, Wei D, Noel M, Holthuijzen PE & Czernichow P 1995 IGF-II gene expression in a rat insulin-producing  $\beta$ -cell line (INS-1) is regulated by glucose. *Diabetologia* **38** 927–935.
- Biarnés M, Montolio M, Nacher V, Raurell M, Soler J & Montanya E 2002  $\beta$ -Cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycaemia. *Diabetes* **51** 66–72.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA & Butler PC 2003  $\beta$ -Cell deficit and increased  $\beta$ -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* **52** 102–110.
- Butler AE, Galasso R, Meier JJ, Basu R, Rizza RA & Butler PC 2007 Modestly increased  $\beta$ -cell apoptosis but no increased  $\beta$ -cell replication in recent-onset type 1 diabetic patients who died of diabetic ketoacidosis. *Diabetologia* **50** 2323–2331.
- Castrillo A, Bodelón OG & Boscá L 2000 Inhibitory effect of IGF-1 on type 2 nitric oxide synthase expression in Ins-1 cells and protection against activation-dependent apoptosis. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetes* **49** 209–217.
- Darville MI & Eizirik DL 1998 Regulation by cytokines of the inducible nitric oxide synthase promoter in insulin-producing cells. *Diabetologia* **41** 1101–1108.
- Devendra D, Liu E & Eisenbarth GS 2004 Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ* **328** 750–754.
- Donath MY, Gross DJ, Cerasi E & Kaiser N 1999 Hyperglycemia-induced  $\beta$ -cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* **48** 738–744.
- Dor Y, Brown J, Martinez OI & Melton DA 2004 Adult pancreatic  $\beta$ -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* **429** 41–46.
- Eizirik DL & Mandrup-Poulsen T 2001 A choice of death. The signal transduction of immune-mediated  $\beta$ -cell apoptosis. *Diabetologia* **44** 2115–2133.
- Eizirik DL, Strandell E, Bendtzen K & Sandler S 1988 Functional characteristics of rat pancreatic islets maintained in culture after exposure to human interleukin 1. *Diabetes* **37** 916–919.
- Eizirik DL, Welsh M, Strandell E, Welsh N & Sandler S 1990 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.
- Giannoukakis N, Mi Z, Rudert WA, Gambotto A, Trucco M & Robbins P 2000 Prevention of  $\beta$ -cell dysfunction and apoptosis activation in human islets by adenoviral gene transfer of the insulin-like growth factor 1. *Gene Therapy* **7** 2015–2022.
- Hill DJ, Petrick J, Arany E, McDonald TJ & Delovitch TL 1999 Insulin-like growth factors prevent cytokine-mediated cell death in isolated islets of Langerhans from pre-diabetic non-obese diabetic mice. *Journal of Endocrinology* **161** 153–165.
- Hill DJ, Strutt B, Arany E, Zaina S, Coukell S & Graham CF 2000 Increased and persistent circulating insulin-like growth factor II in neonatal transgenic mice suppresses developmental apoptosis in the pancreatic islets. *Endocrinology* **141** 1151–1157.
- Hogg J, Han VKM, Clemmons DR & Hill DJ 1993 Interactions of nutrient, insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins in the regulation of DNA synthesis by isolated fetal rat islets of Langerhans. *Journal of Endocrinology* **138** 401–412.
- Hoorens A, Van de Castele M, Kloppel G & Pipeleers D 1996 Glucose promotes survival of rat pancreatic  $\beta$ -cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program. *Journal of Clinical Investigation* **98** 1568–1574.
- Hügl SR, White MF & Rhodes CJ 1998 Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic  $\beta$ -cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells. *Journal of Biological Chemistry* **273** 17771–17779.
- Huotari MA, Palgi J & Otonkoski T 1998 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.
- Ilvemarski V, Jattela M, Saksela E & Voutilainen R 1993 Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma inhibit insulin-like growth factor-II gene expression in human fetal adrenal cell cultures. *Molecular and Cellular Endocrinology* **91** 59–65.
- Larsen CM, Faulenbarch M, Vaag A, Volund A, Ehses JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T & Donath MY 2007 Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* **356** 1517–1526.
- Lin T, Wang DL, Nagpal ML & Cahang W 1994 Recombinant murine tumor necrosis factor alpha inhibits cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and insulin-like growth factor-I gene expression in rat Leydig cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **101** 111–119.
- Lingohr MK, Briaud I, Dickson LM, McCuaig JF, Alarcon C, Wicksteed BL & Rhodes CJ 2006 Specific regulation of IRS-2 expression by glucose in rat primary pancreatic islet  $\beta$ -cells. *Journal of Biological Chemistry* **281** 15884–15892.
- Mabley JG, Belin V, John N & Green IC 1997 Insulin-like growth factor I reverses interleukin-1 $\beta$  inhibition of insulin secretion, induction of nitric oxide synthase and cytokine-mediated apoptosis in rat islets of Langerhans. *FEBS Letters* **417** 235–238.
- Maedler K, Spinas GA, Lehman R, Sergeev P, Weber M, Fontana A, Kaiser N & Donath MY 2001 Glucose induces  $\beta$ -cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes* **50** 1683–1690.
- Maedler K, Schumann DM, Sauter N, Ellingsgaard H, Bosco D, Baertschiger R, Iwakura Y, Oberholzer J, Wollheim CB, Gauthier BR *et al.* 2006 Low concentration of interleukin-1 $\beta$  induces FLICE-inhibitory protein-mediated  $\beta$ -cell proliferation in human pancreatic islets. *Diabetes* **55** 2713–2722.
- Mandrup-Poulsen T 1996 The role of interleukin-1 in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* **39** 1005–1029.
- Martin DM, Carlson R & Feldman EL 1993 Interferon-gamma inhibits DNA synthesis and insulin-like growth factor-II expression in human neuroblastoma cells. *Journal of Neuroscience Research* **34** 489–501.
- Mathis D, Vence L & Benoist C 2001  $\beta$ -Cell death during progression to diabetes. *Nature* **414** 792–798.
- Meier JJ, Butler AE, Saisho Y, Monchamp T, Galasso R, Bhushan A, Rizza RA & Butler PC 2008  $\beta$ -Cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of  $\beta$ -cell mass in humans. *Diabetes* **57** 1584–1594.
- Montanya E, Nacher V, Biarnés M & Soler J 2000 Linear correlation between  $\beta$ -cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats. *Diabetes* **49** 1341–1346.
- Montolio M, Biarnés M, Téllez N, Escoriza J, Soler J & Montanya E 2007 IL-1 $\beta$  and iNOS expression in early syngeneic islet transplantation. *Journal of Endocrinology* **192** 171–179.
- Nácher V, Raurell M, Merino JF, Aranda O, Soler J & Montanya E 1996  $\beta$ -Cell growth and mass are preserved in long-term syngeneic islet transplantation in streptozocin-induced diabetic Lewis rats. *Diabetes* **45** 1541–1546.
- Nir T, Melton DA & Dor Y 2007 Recovery from diabetes in mice by  $\beta$ -cell regeneration. *Journal of Clinical Investigation* **117** 2553–2561.
- Okada T, Liew CW, Hu J, Hinault C, Michael MD, Krtzfeldt J, Yin C, Holzenberger M, Stoffel M & Kulkarni RN 2007 Insulin receptors in beta-cells are critical for islet compensatory growth response to insulin resistance. *PNAS* **104** 8977–8982.

- Parnaud G, Bisco D, Berney T, Pattou F, Kerry-Conte J, Donath MY, Bruun C, Mandrup-Poulsen T, Billestrup N & Halban PA 2008 Proliferation of sorted human and rat  $\beta$ -cells. *Diabetologia* **51** 91–100.
- Persidsky MD & Baillie GS 1977 Fluorometric test of cell membrane integrity. *Cryobiology* **14** 322–331.
- Petrik J, Arany E, McDonald TJ & Hill DJ 1998 Apoptosis in the pancreatic islet cells of the neonatal rat is associated with a reduced expression of insulin-like growth factor II that may act as a survival factor. *Endocrinology* **139** 2994–3004.
- Petrik J, Pell JM, Arany E, McDonald TJ, Dean WL, Reik W & Hill DJ 1999a Overexpression of insulin-like growth factor-II in transgenic mice is associated with pancreatic islet cell hyperplasia. *Endocrinology* **140** 2353–2363.
- Petrik J, Reusens B, Arany E, Remacle C, Coelho C, Hoet JJ & Hill DJ 1999b A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology* **140** 4861–4873.
- Raile K, Berthold A, Banning U, Horn F, Pfeiffer G & Kiess W 2003 IGFs, basic FGF, and glucose modulate proliferation and apoptosis induced by IFN $\gamma$  but not by IL-1 $\beta$  in rat INS-1E  $\beta$ -cells. *Hormone and Metabolic Research* **35** 407–414.
- Robitaille R, Dusseault J, Henley N, Rosenberg L & Hallé JP 2003 Insulin-like growth factor II allows prolonged blood glucose normalization with reduced islet cell mass transplantation. *Endocrinology* **144** 3037–3045.
- Saldeen J 2000 Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common Bcl-2-inhibitable pathway in rat insulin-producing cells. *Endocrinology* **141** 2003–2010.
- Scaglia L, Cahill CJ, Finegood DT & Bonner-Weir S 1997 Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology* **138** 1736–1741.
- Scarim AL, Heitmeier MR & Corbett JA 1997 Irreversible inhibition of metabolic function and islet destruction after a 36-hour exposure to interleukin-1 $\beta$ . *Endocrinology* **138** 5301–5307.
- Sjöholm Å 1991 Inhibition of fetal rat pancreatic  $\beta$ -cell replication by interleukin-1 $\beta$  *in vitro* is not mediated through pertussis toxin-sensitive G-proteins, a decrease in cyclic AMP, or protease activation. *FEBS Letters* **289** 249–252.
- Southern C, Schulster D & Green IC 1990 Inhibition of insulin secretion from rat islets of Langerhans by interleukin-6. An effect distinct from that of interleukin-1. *Biochemical Journal* **272** 243–245.
- Spinas GA, Palmer JP, Mandrup-Poulsen T, Andersen H, Nielsen JH & Nerup J 1988 The bimodal effect of interleukin 1 on rat pancreatic  $\beta$ -cells –stimulation followed by inhibition– depends upon dose, duration of exposure, and ambient glucose concentration. *Acta Endocrinologica* **119** 307–311.
- Swenne I 1982 The role of glucose in the *in vitro* regulation of cell cycle kinetics and proliferation of fetal pancreatic B-cells. *Diabetes* **31** 754–760.
- Téllez N, Montolio M, Biarnés M, Castaño E, Soler J & Montanya E 2005 Adenoviral overexpression of interleukin-1 receptor antagonist protein increases  $\beta$ -cell replication in rat pancreatic islets. *Gene Therapy* **12** 120–128.
- Téllez N, Montolio M, Estil·les E, Escoriza J, Soler J & Montanya E 2007 Adenoviral overproduction of interleukin-1 receptor antagonist increases  $\beta$ -cell replication and mass in syngeneically transplanted islets, and improves metabolic outcome. *Diabetologia* **50** 602–611.
- Vasavada RC, Gonzalez-Pertusa JA, Fujinaka Y, Fiaschi-Taesch N, Cozar-Castellano I & Garcia Ocaña A 2006 Growth factors and  $\beta$ -cell replication. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38** 931–950.

Received in final form 27 May 2009

Accepted 10 July 2009

Made available online as an Accepted Preprint

10 July 2009

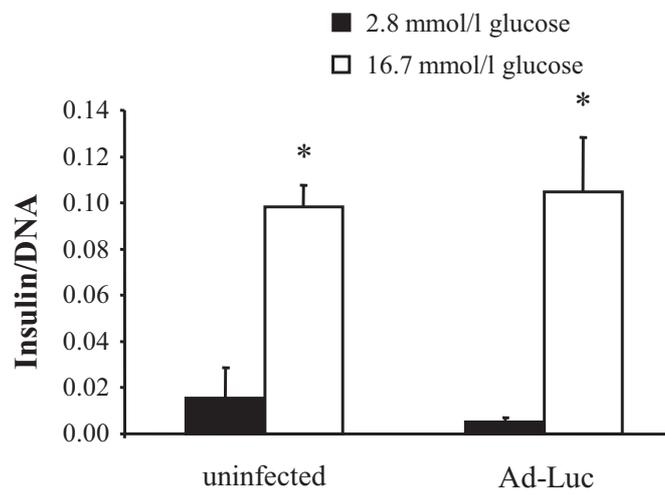
## Supplementary figure Legends

### Supplementary figure 1

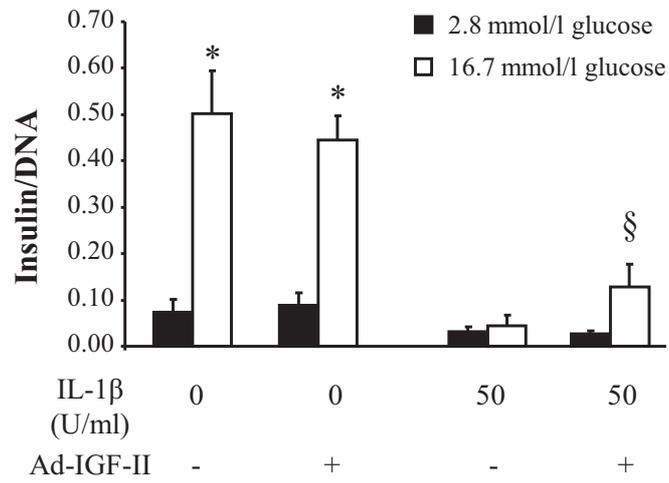
Glucose-induced insulin secretion in control uninfected and Ad-Luc-infected islets (48 h after infection) incubated at 2.8 or 16.7 mmol/l glucose for 1 hour. Insulin release is expressed as ng of insulin/10 islets/1 h and DNA as ng of DNA/10 islets. Values are means  $\pm$  SE. (n=3) \* $p < 0.05$  between 2.8 and 16.7 mmol/l glucose.

### Supplementary figure 2

Effect of IL- $\beta$  and IGF-II overexpression on glucose-induced insulin secretion. Control uninfected and Ad-IGF II infected islets were exposed to 50 U/ml of IL-1 $\beta$  for 48 h and incubated at 2.8 or 16.7 mmol/l glucose for 1 hour. Insulin release is expressed as ng of insulin/10 islets/1 h and DNA as ng of DNA/10 islets. Values are means  $\pm$  SE. (n=3) \* $p < 0.05$  between 2.8 and 16.7 mmol/l glucose,  $\$p = 0.077$  between Ad-IGF-II islets exposed to 50 U/ml IL-1 $\beta$  incubated to 2.8 or 16.7 mmol/l glucose.



Supplementary Fig.1.



Supplementary Fig.2.

**ESTUDI 2:**

**Increased beta cell replication, and beta cell mass regeneration in syngeneically transplanted rat islets overexpressing insulin-like growth factor-II**

**Elisabet Estil·les, Noèlia Téllez, Jessica Escoriza i Eduard Montanya.**

Cell Transplantation (2012) 21, 2119-2129.



## **ANTECEDENTS**

És ben conegut que els primers dies després del trasplantament d'illots pancreàtics es dona una important pèrdua de la massa beta trasplantada, aquesta pèrdua contribueix a l'augment del requeriment de teixit beta trasplantat necessari per assolir la normoglicèmia del receptor. D'altra banda, els efectes d'IGF2 com a factor regulador del creixement i promotor de la proliferació i la supervivència de les cèl·lules beta han estat àmpliament contrastats.

## **OBJECTIUS**

Estudiar els efectes de la sobreexpressió d'IGF2 sobre la proliferació i la massa beta dels illots trasplantats i determinar si mitjançant la sobreexpressió d'IGF2 es millora el pronòstic del trasplantament.

## **MODEL EXPERIMENTAL**

L'estudi es va realitzar mitjançant un model de trasplantament d'illots singènics a animals hiperglicèmics per administració d'una única dosi d'estreptozotocina (STZ). El model singènic permet descartar la contribució del rebuig i evita l'ús de tractaments immunosupressors, que poden ser tòxics pel teixit trasplantat i conduir a la pèrdua de teixit insular després del trasplantament. La utilització d'animals diabètics ens permet estudiar l'efecte sobre els illots trasplantats de les concentracions elevades de glucosa en sang i la seva relació amb l'IGF2.

Per comprovar els efectes beneficiosos d'IGF2 i la seva capacitat en reduir el nombre d'illots necessaris per restablir la normoglicèmia, es van trasplantar 800 illots que és una massa insular subcrítica per aconseguir l'euglicèmia del receptor, a animals que havien esdevingut diabètics mitjançant l'administració d'una única dosi de STZ. La massa subcrítica es defineix com aquella massa lleugerament inferior a la massa necessària per restablir la normoglicèmia en animals diabètics i amb la que s'espera que la majoria dels animals es mantindran hiperglicèmics, permetent-nos observar diferències en el percentatge d'animals curats entre el grup trasplantat amb illots control i el grup trasplantat amb illots que sobreexpressen l'IGF2.

Per l'estudi de l'apoptosi, la proliferació, l'àrea individual de les cèl·lules beta i la massa beta, es van trasplantar 500 illots, que és una massa insular clarament insuficient per restablir la normoglucèmia, amb l'objectiu de mantenir els animals hiperglucèmics al llarg de tot l'estudi, assegurant d'aquesta manera les mateixes condicions metabòliques tant en el grup trasplantat amb illots control no infectats com en el grup trasplantat amb illots que sobreexpressaven l'IGF2.

## **RESULTATS**

### **Eficiència de la infecció**

24 hores després de la infecció amb adenovirus vam determinar, tal i com indicava la producció de GFP sota un microscopi confocal, que el 100% dels illots van resultar infectats, i d'altra banda, que la eficiència de la infecció, determinada mitjançant citometria de flux a nivell de les cèl·lules individuals dispersades dels illots, era del 20%. La visualització *in vivo* de illots infectats amb Ad-GFP sota un microscopi confocal també ens va permetre determinar que l'expressió de la proteïna exògena es situava principalment a la perifèria dels illots. En l'estudi 1, havíem demostrat que aquest percentatge d'infecció era suficient per doblar la replicació de les cèl·lules beta *in vitro* en els illots que sobreexpressaven IGF2.

### **Expressió d'IGF2**

La tinció específica amb un anticòs anti-IGF2 va confirmar la producció d'IGF2 en els illots infectats i la seva absència en els illots no infectats, tant abans del trasplantament com en tots els dies d'estudi post-trasplantament (Fig. 1), l'expressió del transgen es limitava en l'empelt d'illots i no era present en el teixit renal circumdant.

### **Efectes de la sobreexpressió d'IGF2 sobre la funció de les cèl·lules beta dels illots**

Com a indicador de la funció beta es va utilitzar la capacitat de les cèl·lules beta per secretar insulina en resposta a glucosa. Tant 48 hores com 7 dies després de la infecció amb adenovirus,

la secreció d'insulina estimulada per glucosa, era similar en els illots control no infectats i en els illots que sobreexpressaven IGF2, indicant que la funció beta no es trobava afectada per la sobreexpressió d'IGF2.

### **La sobreexpressió d'IGF2 millora l'evolució metabòlica de l'empelt**

Per determinar els efectes de la sobreexpressió d'IGF2 sobre el pronòstic del trasplantament, es van trasplantar 800 illots control no infectats, 800 illots infectats amb Ad-Luc o 800 illots que sobreexpressaven IGF2 a rates Lewis diabètiques per STZ. Cal remarcar que 800 illots és una massa subcrítica, amb la que s'esperava que només una part dels animals trasplantats aconseguissin la normoglicèmia.

El 100% dels animals trasplantats amb illots que sobreexpressaven IGF2 van restablir la normoglicèmia el dia 10 post-trasplantament i van mantenir la glucèmia normalitzada fins l'extracció de l'empelt el dia 60 després del trasplantament (Fig. 2A). En canvi, només el 14% dels animals trasplantats amb 800 illots control no infectats o amb 800 illots Ad-Luc eren normoglicèmics a dia 10 després del trasplantament. Aquests animals van mostrar nivells de hiperglicèmia estadísticament significativa al llarg de tot l'estudi, i només el 71% van arribar a assolir nivells normals de glucèmia post-trasplantament. L'anàlisi de l'evolució metabòlica després del trasplantament dels diferents grups es va realitzar mitjançant el mètode de Kaplan Meier, que va confirmar estadísticament la millor evolució metabòlica del grup d'animals trasplantats amb 800 illots que sobreexpressaven IGF2 respecte els grups trasplantats amb illots control no infectats i amb illots infectats amb Ad-Luc (Fig. 2B).

Després de l'extracció dels empelts (dia 60 post-trasplantament) es va donar una recurrència a la hiperglicèmia en tots els animals, demostrant que la recuperació dels nivells de glucosa en sang era deguda a la funció dels illots trasplantats i no a la recuperació del pàncrees endogen (Fig. 2A).

### **Test de tolerància a la glucosa**

El test de tolerància a la glucosa es va realitzar en els tres grups d'animals trasplantats (animals trasplantats amb illots control no infectats, animals trasplantats amb illots que sobreexpressaven Luciferasa i animals trasplantats amb illots que sobreexpressaven IGF2), així com en un grup control d'animals no trasplantats que no havien estat tractats amb STZ. Després de la injecció de glucosa els animals trasplantats dels tres grups manifestaven intolerància a la glucosa (Fig. 2C). Tot i així, la intolerància a la glucosa era més lleu en el grup Ad-IGF2, ja que presentava valors inferiors d'hiperglucèmia que els grups control no infectats i Ad-Luc als 30, 60 o 90 minuts després de l'administració de glucosa, i assolía nivells de glucosa similars als del grup d'animals no trasplantats no tractats amb STZ als 120 minuts de la injecció de glucosa.

L'àrea sota la corba (AUC) era també inferior en el grup d'animals trasplantats amb illots que sobreexpressaven IGF2 [1635 mmol/L·min (IQR: 902)] respecte el grup trasplantat amb illots control no infectats [2339 mmol/L·min (IQR: 1054)  $p=0.035$ ] o el grup trasplantat amb illots Ad-Luc [2697 mmol/L·min (IQR: 1694)  $p=0.064$ ].

### **La sobreexpressió d'IGF2 augmenta la replicació i la massa beta trasplantada**

És conegut que la glucosa modifica la replicació, l'apoptosi i la massa beta, per tant les diferències observades en els nivells de glucèmia entre els animals trasplantats amb 800 illots que sobreexpressaven IGF2 i els animals trasplantats amb 800 illots control no infectats o 800 illots Ad-Luc, podria impedir realitzar una comparació vàlida entre els diferents grups. Per tant, per tal d'assegurar condicions metabòliques comparables entre els empelts dels diferents grups al llarg de tot l'estudi, es van trasplantar rates diabètiques per injecció única de STZ amb 500 illots Ad-IGF2 o 500 illots control no infectats. Cal remarcar que 500 illots és una massa clarament insuficient per restablir la normoglucèmia en aquest model. En conseqüència, tots els animals trasplantats van mantenir nivells similars d'hiperglucèmia durant tot l'estudi (Taula 1).

### **Proliferació de les cèl·lules beta dels illots trasplantats**

La replicació de les cèl·lules beta es va determinar en els empelts d'illots extrets a dia 3, 10 i 28 després del trasplantament i en pàncrees de rates sanes. En els empelts d'illots que sobreexpressaven IGF2 la replicació de les cèl·lules beta estava significativament augmentada en tots els dies d'estudi respecte els empelts d'illots control no infectats (dia 3: [1.45% (IQR: 0.26)] vs [0.58% (IQR: 0.18)]  $p=0.006$ ; dia 10: [1.58% (IQR: 1.40)] vs [0.90% (IQR: 0.61)]  $p=0.035$ ; i dia 28: [1.35% (IQR: 0.35)] vs [0.64% (IQR: 0.28)]  $p=0.004$ ) i també es trobava incrementada en comparació amb la replicació del pàncrees d'animals sans [0.36% (IQR:0.17)]  $p=0.02$  (Fig. 3B).

Malgrat que la glucosa és un bon estimulador de la replicació de les cèl·lules beta, en els empelts d'illots control no infectats, la replicació va augmentar significativament només el dia 10 després del trasplantament, i no estava estimulada ni el dia 3 ni el dia 28 respecte el pàncrees de rates sanes, confirmant observacions prèvies que indicaven que la replicació de les cèl·lules beta es troba inhibida els primers dies després del trasplantament així com després de l'exposició a l'hiperglucèmia. La sobreexpressió d'IGF2 va restaurar la resposta replicativa beta en aquestes dues situacions.

### **Apoptosi de les cèl·lules beta dels illots trasplantats**

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

L'apoptosi de les cèl·lules beta dels illots trasplantats es trobava augmentada en tots els temps d'estudi després del trasplantament tant en el grup trasplantat amb illots control no infectats (dia 3: [0.53% (IQR: 0.12)], dia 10: [0.81% (IQR: 0.49)] i dia 28: [0.57% (IQR: 0.32)]) com en el grup trasplantat amb illots que sobreexpressaven IGF2 (dia 3: [0.46% (IQR: 0.30)], dia 10: [0.63% (IQR: 0.12)] i dia 28: [0.51% (IQR: 0.28)]) respecte l'apoptosi basal que hi ha en el pàncrees d'animals sans [0.04% (IQR:0.08)]  $p=0.01$  (Fig. 4A). No hi havia diferències entre els grups Ad-IGF2 i els grups control no infectats en els diferents dies d'estudi.

### **Àrea individual de les cèl·lules beta dels illots trasplantats**

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

L'àrea de les cèl·lules beta va augmentar el dia 10 després del trasplantament en ambdós grups, control i IGF2, i es va mantenir augmentada el dia 28 en comparació amb l'àrea individual de les cèl·lules beta dels illots abans de trasplantar i els illots 3 dies després del trasplantament (Fig. 4B). L'àrea individual de les cèl·lules beta era similar entre els empelts d'illots del grup control i del grup IGF2 al llarg de l'estudi.

### **Evolució de la massa beta trasplantada**

Es va analitzar la massa beta dels empelts d'illots control i dels empelts d'illots que sobreexpressaven IGF2 després de 3, 10 i 28 dies del trasplantament així com dels illots just abans de trasplantar per tal de determinar les repercussions que podrien tenir les diferències descrites entre els empelts d'illots que sobreexpressaven IGF2 i els empelts d'illots control sobre l'evolució de la massa beta trasplantada.

La massa beta inicialment trasplantada (control: [1.60 mg (IQR: 0.22)]; IGF2: [1.61 mg (IQR: 0.15)]) es va veure dràsticament reduïda el dia 3 després del trasplantament tant en el grup control [0.38 mg (IQR: 0.19)]  $p=0.006$  com en el grup IGF2 [0.36 mg (IQR: 0.26)]  $p=0.006$  (Fig. 5).

En el grup IGF2, la massa beta es va recuperar en el dia 10 després del trasplantament assolint un valor similar al de la massa beta inicialment trasplantada [1.27 mg (IQR: 0.91)], i el dia 28 post-trasplantament es mantenia superior a la massa beta del grup control control [0.63 mg (IQR: 0.38)] vs [0.42 mg (IQR: 0.31)]  $p=0.008$  reflectint l'elevada replicació beta trobada en els illots trasplantats que sobreexpressaven IGF2.

En canvi, en el grup control la massa beta va ser sempre inferior a la massa beta inicialment trasplantada ( $p=0.02$ ), tot i que va incrementar de forma transitòria el dia 10 després del trasplantament, d'acord amb la replicació més elevada i la major mida individual de les cèl·lules beta determinades en aquest punt, la massa beta dels empelts d'illots control va caure de nou

el dia 28 quan la replicació de les cèl·lules beta estava inhibida i no podia compensar l'increment de l'apoptosi que es donava després de 28 dies del trasplantament.

## **CONCLUSIONS**

La sobreexpressió d'IGF2 en els empelts d'illots indueix un increment en la replicació de les cèl·lules beta trasplantades i en la massa beta de l'empelt, sense provocar canvis en l'apoptosi ni la mida individual de les cèl·lules beta dels illots trasplantats. Aquests efectes beneficiosos de la sobreexpressió d'IGF2 es tradueixen en una millora en l'evolució metabòlica dels animals diabètics trasplantats, indicant que les estratègies terapèutiques que augmenten la proliferació beta poden incrementar la massa beta que s'implanta després del trasplantament d'illots pancreàtics i, en conseqüència, reduir el numero d'illots que es requereixen per assolir la normogluccèmia.



## Increased $\beta$ -Cell Replication and $\beta$ -Cell Mass Regeneration in Syngeneically Transplanted Rat Islets Overexpressing Insulin-Like Growth Factor II

Elisabet Estil·les,\*† Noèlia Téllez,\*† Jessica Escoriza,‡ and Eduard Montanya\*†‡

\*Laboratory of Diabetes and Experimental Endocrinology, Department of Clinical Sciences, IDIBELL-University of Barcelona, Barcelona, Spain

†CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Barcelona, Spain

‡Endocrine Unit (15), IDIBELL-Hospital Universitari Bellvitge, Barcelona, Spain

Insulin-like growth factor II (IGF2) is a growth-promoting peptide that increases  $\beta$ -cell proliferation and survival. The aim of the study was to determine the effect of IGF2 overexpression on  $\beta$ -cell mass in transplanted islets. Islets infected with adenovirus encoding for IGF2 (Ad-IGF2 group), for luciferase (Ad-Luc control group), or with uninfected islets (control group) were syngeneically transplanted to streptozotocin-diabetic Lewis rats. Eight hundred islets, a minimal mass model to restore normoglycemia, or 500 islets, a clearly insufficient mass, were transplanted. Rats transplanted with 800 Ad-IGF2 islets showed a better metabolic evolution than control groups. As expected, rats transplanted with 500 Ad-IGF2 or control islets maintained similar hyperglycemia throughout the study, ensuring comparable metabolic conditions among both groups.  $\beta$ -Cell replication was higher in Ad-IGF2 group than in control group on days 3 [1.45% (IQR: 0.26) vs. 0.58% (IQR: 0.18),  $p=0.006$ ], 10 [1.58% (IQR: 1.40) vs. 0.90% (IQR: 0.61),  $p=0.035$ ], and 28 [1.35% (IQR: 0.35) vs. 0.64% (IQR: 0.28),  $p=0.004$ ] after transplantation.  $\beta$ -Cell mass was similarly reduced on day 3 after transplantation in Ad-IGF2 and control group [0.36 mg (IQR: 0.26) vs. 0.38 mg (IQR: 0.19)], it increased on day 10, and on day 28 it was higher in Ad-IGF2 than in control group [0.63 mg (IQR: 0.38) vs. 0.42 mg (IQR: 0.31),  $p=0.008$ ]. Apoptosis was similarly increased in Ad-IGF2 and control islets after transplantation. No differences in insulin secretion were found between Ad-IGF2 and uninfected control islets. In summary, IGF2 overexpression in transplanted islets increased  $\beta$ -cell replication, induced the regeneration of the transplanted  $\beta$ -cell mass, and had a beneficial effect on the metabolic outcome reducing the  $\beta$ -cell mass needed to achieve normoglycemia.

Key words: Insulin-like growth factor II (IGF2); Islet transplantation; Pancreatic  $\beta$ -cell;  $\beta$ -Cell mass;  $\beta$ -Cell proliferation

### INTRODUCTION

Islet transplantation restores normoglycemia in type 1 diabetic patients (44), but with time hyperglycemia recurs in most patients despite the maintenance of partial graft function (40). The cause of the progressive loss of insulin independence is not well established and is probably multifactorial. Damage of transplanted islets due to rejection, recurrence of autoimmunity,  $\beta$ -cell toxicity of immunosuppressive therapy, and metabolic stress may contribute to the long-term failure of islet grafts (23). The amount of transplanted islet tissue determines also the outcome of islet transplantation. A high islet mass must be transplanted to achieve normoglycemia, probably due to the massive destruction of islets taking place in the initial days after transplantation (5,8), and the number of initially transplanted islets contributes to late function or failure of the graft (22,48,51). Since the islet mass that

becomes engrafted is low, minimal additional losses may determine the recurrence of hyperglycemia (23). Thus, new strategies aimed to preserve or increase the engrafted  $\beta$ -cell mass are needed to improve the current success rate of islet transplantation.

Insulin-like growth factors I and II (IGF1, IGF2) are potent cell growth regulators that promote proliferation and survival in  $\beta$ -cells (50). The effects of IGF2 have been demonstrated in  $\beta$ -cell lines, in rat and human  $\beta$ -cells, and in transgenic mice (2,13,18–20,35,37). An autocrine role of IGF2 in protecting  $\beta$ -cells against apoptosis was also recently proposed (7). It may be expected that these beneficial effects of IGF2 could be useful to increase  $\beta$ -cell mass in islet transplantation. Interestingly, an association has been recently described between insulin-like growth factor II mRNA binding protein 2 (IGF2BP2), that binds to the leader elements in the untranslated regions of IGF2

Received March 15, 2010; final acceptance December 13, 2011. Online prepub date: April 10, 2012.

Address correspondence to Eduard Montanya, Endocrine Unit (15), Hospital Universitari Bellvitge, Feixa Llarga, s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Tel: +34-93-4037265; Fax: +34-93-2607561; E-mail: [montanya@ub.edu](mailto:montanya@ub.edu)

transcripts and regulates IGF2 translation during late mammalian development (32) and type 2 diabetes (41,43,54). However, some studies have suggested that IGF2 overexpression may have deleterious effects on islet cells. Transgenic mice overexpressing IGF2 show large and irregular shape in islets with disrupted islet architecture (9,35), a left shift in the dose–response curve relating insulin secretion and glucose concentration, and they develop diabetes (9). Transgenic mice expressing IGF2 in  $\beta$ -cells have a higher susceptibility to streptozotocin-induced  $\beta$ -cell damage, and double transgenic interferon (IFN)- $\beta$ /IGF2 mice develop spontaneous diabetes (1). Thus, although IGF2 may have a beneficial role on  $\beta$ -cells, acting as a mitogenic and prosurvival factor, the transgenic data suggest that sustained overexpression of IGF2 could increase the susceptibility of islets to damage. In order to determine the effects of IGF2 overexpression on islet transplantation, and in particular on the graft  $\beta$ -cell mass, we transplanted streptozotocin-diabetic rats with syngeneic islets infected with an adenovirus encoding for IGF2.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

Animal experimental procedures were reviewed and approved by the ethical committee of the University of Barcelona. Male inbred Lewis rats (Harlan Laboratories), aged 7–10 weeks, were used as donors and recipients of transplantation. The recipients were made diabetic by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO, USA), 60 mg/kg body weight, freshly dissolved in citrate buffer (pH 4.5). Diabetes was confirmed by the presence of hyperglycemia, polyuria, and no weight gain. Only rats with a blood glucose of >20 mmol/L on a minimum of two consecutive measurements were transplanted. Blood glucose was determined between 9:00 and 11:00 AM in nonfasting conditions. Blood was obtained from the snipped tail, and glucose was measured with a portable meter (Glucocard Memory, A. Menarini Diagnostics, Barcelona, Spain).

### *Experimental Groups*

To determine the effects of IGF2 overproduction on the metabolic outcome of the graft, STZ-diabetic rats were randomly transplanted with 800 islets infected with an adenovirus (Ad) encoding for IGF2 (Ad-IGF2 group,  $n=7$ ), encoding for luciferase (Ad-Luc, control vector group,  $n=7$ ), or with uninfected islets (control uninfected group,  $n=7$ ). Eight hundred islets is a borderline  $\beta$ -cell mass that can restore normoglycemia in some, but not all, STZ-diabetic rats (4). The grafts were removed on day 60 after transplantation. One day before graft harvesting an intraperitoneal glucose tolerance tests (IPGTT) was performed. After graft removal, blood glucose was determined to assess the recurrence of hyperglycemia. A group

of control nontransplanted rats ( $n=6$ ) had their blood glucose and body weight determined weekly.

To determine the effects of IGF2 on  $\beta$ -cell replication, apoptosis, and mass, STZ-induced diabetic rats were randomly transplanted with 500 Ad-IGF2-infected islets or with 500 uninfected islets. Transplantation of 500 islets provides a clearly insufficient  $\beta$ -mass to restore normoglycemia in this model, and the animals were expected to remain hyperglycemic after transplantation (4). Since glucose is known to modify  $\beta$ -cell replication, apoptosis, and mass, we used this model to ensure comparable metabolic conditions among groups throughout the study. Since cytopathic effects have been reported in association with adenoviral infection (3), we compared the Ad-IGF2-infected islets with the potentially better control group of uninfected islets. Grafts were removed 3 ( $n=12$ ), 10 ( $n=12$ ), and 28 ( $n=12$ ) days after transplantation (six groups,  $n=6$  for each experimental group). A group of 8- to 10-week-old normal rats ( $n=5$ ) had their pancreas harvested to determine normal  $\beta$ -cell replication and apoptosis.

### *Recombinant Adenoviruses*

E1/E3-deleted adenoviral vector was used for islet transfection. Adenovirus encoding for green fluorescent protein (Ad-GFP) was used to assess the efficiency of infection. The adenoviruses Ad-GFP, Ad-Luc, and Ad-IGF2 were generated by Pacific Northwest Research Institute (Seattle, WA, USA). The transgene was driven by the cytomegalovirus (CMV) promoter.

### *Islet Isolation and Gene Transfer*

Islets were isolated by collagenase (Collagenase P; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) digestion of the pancreas as previously described (31). Isolated islets were hand-picked under a stereomicroscope two or three times, until a population of pure islets was obtained. Islets were washed in serum-free RPMI 1640 11.1 mmol/L glucose (Sigma Immunochemicals) supplemented with 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin before infection. Groups of 200 islets were infected with Ad-IGF2 or with Ad-Luc at a plaque-forming unit (pfu) of  $7 \times 10^7$  in 400  $\mu$ l of serum-free RPMI 1640 11.1 mmol/L glucose for 2 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After infection, islets were washed three times in RPMI 1640 containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and incubated overnight in non-tissue culture-treated plastic ware at 37°C in serum-containing medium at 11.1 mmol/L of D-glucose. Uninfected islets had the same treatment as infected islets, but in the absence of adenovirus.

### *Islet Transplantation and Graft Harvesting*

After overnight incubation, Ad-IGF2-infected, Ad-Luc-infected, and uninfected islets were counted into groups of 500 or 800 islets and transplanted under the

left kidney capsule of the recipients (31). To harvest the graft, the kidney capsule surrounding the graft was incised and removed with the graft. The grafts were immediately immersed in 4% paraformaldehyde-PBS, were fixed overnight, and, after removal of any excess paraformaldehyde by capillary action, were weighed (31).

#### *Intraperitoneal Glucose Tolerance Test*

The intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) was performed 1 day before graft harvesting. Glucose (2 g/kg) was administered intraperitoneally to conscious animals after a 2-h fast. Blood glucose was measured at 0, 30, 60, 90, and 120 min after injection. Nondiabetic nontransplanted rats ( $n=6$ ) were used as normal controls. Total area under the curve (AUC) was determined using the trapezoidal rule method.

#### *Efficiency of Infection*

The efficiency of infection was quantified in Ad-GFP-infected islets 24 h after infection, islets were dispersed into single cells and analyzed by flow cytometry, as previously described (45).

IGF2 production was determined by immunohistochemistry in islets before and after transplantation. Graft sections were incubated overnight at 4°C with a rabbit anti-human IGF2 antibody (final dilution 1:100) (Novozymes GroPep, Adelaide, Australia). Preparations were visualized with LSAB+ System-HRP (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA).

#### *Insulin Secretion*

To determine whether IGF2 overexpression modified  $\beta$ -cell function, glucose-stimulated insulin secretion was used as a functional assay. Ad-IGF2-infected and control uninfected islets were cultured for 2 and 7 days with RPMI 1640 medium supplemented with 11.1 mmol/L glucose and 10% FCS. Cultured islets were preincubated 1 h at 37°C in triplicate groups of 10 islets in 1 ml of fresh Krebs–Ringer bicarbonate buffer supplemented with HEPES and bovine serum albumin (BSA) (KRBH buffer) containing 2.8 mmol/L glucose. The medium was removed, and islets were incubated at 37°C with 1 ml of KRBH buffer containing 2.8 or 16.7 mmol/L glucose for an additional hour with continuous shaking (45). Supernatants were removed and stored at –80°C until assayed for insulin. Insulin was measured by ELISA (Mercodia Rat insulin ELISA, Mercodia AB, Uppsala, Sweden) and was corrected by DNA content. Islets were disrupted by sonication, and DNA content was determined by a fluorimetric assay, as previously described (45).

#### *$\beta$ -Cell Apoptosis*

Sections were double-stained by immunoperoxidase for apoptotic nuclei using the terminal deoxynucleotidyl

transferase biotin-dUTP nick end labeling (TUNEL) technique (In Situ Cell Death Detection Kit, ApopTag; Intergene, Oxford, UK) (5,28) and by alkaline phosphatase for the endocrine non- $\beta$ -cells of the islets. A cocktail of antibodies (DakoCytomation) including rabbit anti-swine glucagon (final dilution 1:1,000), rabbit anti-human somatostatin (final dilution 1:1,000), and rabbit anti-human pancreatic polypeptide (final dilution 1:500) was used (5). When assessing apoptotic nuclei, we excluded necrotic regions.  $\beta$ -Cell apoptosis was also determined in the pancreases of normal Lewis rats.  $\beta$ -Cell apoptosis in islet grafts and in control pancreas was expressed as percentage of TUNEL-positive  $\beta$ -cells, and a minimum of 1,200  $\beta$ -cells were counted per sample.

#### *$\beta$ -Cell Replication*

Rats were injected with the thymidine analogue 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO, USA), 100 mg/kg body weight IP, 6 h before removing the graft (27). Sections were double-stained with immunoperoxidase for BrdU using a cell proliferation kit (Amersham, Amersham, UK) with a modified protocol (5,28) and for endocrine non- $\beta$ -cells of the islets using the cocktail of antibodies described above. Sections were also double-stained for BrdU and for  $\beta$ -cells with a rabbit anti-human insulin antibody (final dilution 1:50) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).  $\beta$ -Cell replication was also measured in the pancreases of normal Lewis rats injected with BrdU 6 h before pancreas excision.  $\beta$ -Cell replication in islet grafts and in control pancreas was expressed as percentage of BrdU-positive  $\beta$ -cells, and a minimum of 1,200  $\beta$ -cells were counted per sample.

#### *Individual $\beta$ -Cell Area*

The mean cross-sectional area of individual  $\beta$ -cells, a measure of  $\beta$ -cell size, was determined using image-analytical software (AnalySIS 3.0; Soft Imaging System, Münster, Germany). The individual  $\beta$ -cell area on the day of transplantation was determined in sections from the five groups of 500 isolated islets that were used to measure the initially transplanted  $\beta$ -cell mass. For both grafts and isolated islets, the perimeter of the  $\beta$ -cell tissue on a random field was carefully traced on the computer's monitor to exclude any other tissue, and the total  $\beta$ -cell area and  $\beta$ -cell nuclei ( $392 \pm 25$  nuclei per sample) in that field were determined. To calculate the area of the individual  $\beta$ -cells, the total  $\beta$ -cell area in the field was divided by the number of  $\beta$ -cell nuclei (5,28).

#### *$\beta$ -Cell Mass*

$\beta$ -Cell mass was measured by point-counting morphometry (52), as previously described (28,31).  $\beta$ -Cell

mass was obtained by multiplying the weight of the graft by the relative  $\beta$ -cell volume. In addition, the  $\beta$ -cell mass of islets at the time of transplantation was determined in five groups of 500 islets isolated on different days. Islets were pelleted and then fixed and weighed as described for islet grafts. The islets  $\beta$ -cell mass was obtained by multiplying the weight of the islets by the percentage of  $\beta$ -cell volume, determined with image-analytical software (AnalySIS 3.0; Soft Imaging System) on sections of the islet pellets.

#### Statistical Analysis

Statistics were performed using SPSS 14.0 (Chicago, IL, USA) for Windows and differences among groups were evaluated using the Kruskal–Wallis  $H$  test, and when determined as significant ( $p < 0.05$ ), the Mann–Whitney  $U$  test was used to determine specific differences between groups. Subsequently, the Bonferroni correction was used as post hoc test to adjust the type I error ( $\alpha$ ) for multiple testing. Since the use of adjustments for multiple tests has been questioned, as it increases the likelihood of type II errors, the result of the Mann–Whitney  $U$  test is presented when it is statistically significant, and it is followed by the adjustment with the Bonferroni correction. Results are expressed as median values and interquartile range (IQR). In figures, mean  $\pm$  SEM is given to describe the data as it is a better known and more widely used descriptor. The Kaplan–Meier method was used to analyze the metabolic evolution after transplantation, and the differences among the survival curves were compared by the log-rank test with subsequent Bonferroni correction.

## RESULTS

#### Efficiency of Adenoviral Infection

At 24 h after infection 100% of islets and 20% of the individual islet cells were infected, as indicated by GFP production. We have previously shown that this rate of infection is sufficient to double  $\beta$ -cell replication in vitro in Ad-IGF2 infected islets (13). The expression of the

transgene was predominantly found in peripheral cells of the islets. Specific staining with IGF2 antibody showed a clear production in Ad-IGF2-infected islets, both before transplantation and at all time points after transplantation (Fig. 1). No IGF2 expression was found in noninfected islets or in the renal parenchyma surrounding the transplanted Ad-IGF2-infected islets.

#### $\beta$ -Cell Function in Infected Islets

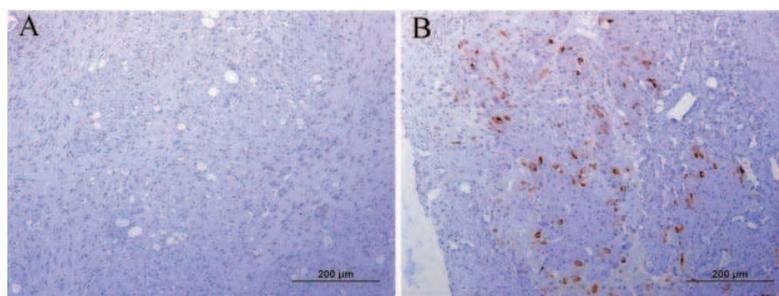
Glucose-stimulated insulin secretion was similar in Ad-IGF2-infected islets and in uninfected islets 48 h and 7 days after infection, indicating that  $\beta$ -cell function was unaffected in infected islets overexpressing IGF2 (data not shown).

#### IGF2 Overexpression Improved the Metabolic Outcome of Islet Grafts

**Blood Glucose.** To explore the effects of IGF2 overexpression on the outcome of islet grafts, STZ-diabetic rats were transplanted with 800 syngeneic islets, a marginal  $\beta$ -cell mass to achieve normoglycemia. All animals transplanted with 800 Ad-IGF2-infected islets achieved normoglycemia on day 10 after transplantation and remained normoglycemic until graft removal on day 60 (Fig. 2A). In contrast, only 14% of animals transplanted with 800 Ad-Luc infected islets or with 800 control uninfected islets were normoglycemic on day 10 after transplantation. Normoglycemia was eventually achieved on days 21–28 after transplantation in most but not all rats (71%) transplanted with uninfected islets or with Ad-Luc-infected islets. The improved metabolic evolution of Ad-IGF2 group was confirmed by the statistically significant difference in the Kaplan–Meier survival curve (Fig. 2B). In all normoglycemic rats, graft harvesting was followed by recurrence of severe hyperglycemia.

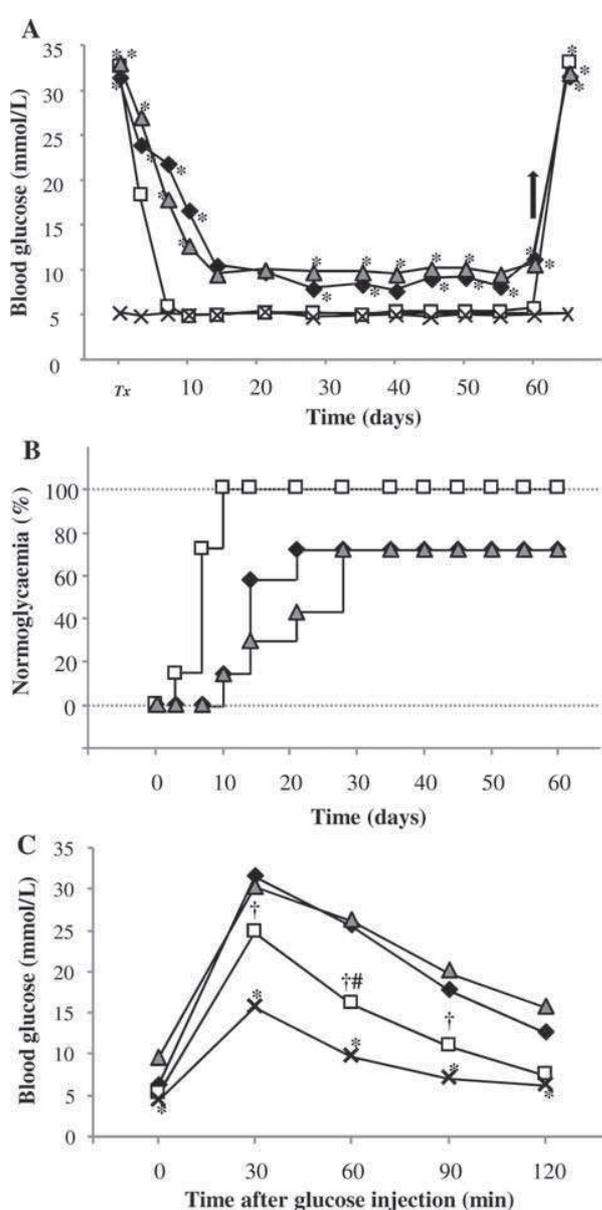
#### Intraperitoneal Glucose Tolerance Test

The IPGTT was performed in all three groups transplanted with 800 islets and in control non-STZ-injected



**Figure 1.** Insulin-like growth factor II (IGF2) expression (brown) in islet grafts from control uninfected group (A) and from adenovirus infected (Ad)-IGF2 group on day 10 after transplantation (B).

rats. All transplanted groups showed glucose intolerance with higher hyperglycemia after glucose injection than control nontransplanted non-STZ-injected animals (Fig. 2C). Nevertheless, glucose intolerance was milder in Ad-IGF2 group that was less hyperglycemic than uninfected control and Ad-Luc groups 30, 60, or 90 min after glucose injection and achieved glucose values similar to control non-STZ-injected animals after 120 min. The AUC was also lower in Ad-IGF2 group [1,635 mmol/L·min (IQR: 902)] than in control uninfected group [2,339 mmol/L·min (IQR: 1,054),  $p=0.035$ ] or in Ad-Luc [2,697 mmol/L·min (IQR: 1,694),  $p=0.064$ ], although the differences did not remain statistically significant after adjustment for multiple comparisons.



### IGF2 Overexpression Increased Transplanted $\beta$ -Cell Replication and Mass

Since glucose is known to modify  $\beta$ -cell replication, apoptosis, and mass, the differences in blood glucose levels between Ad-IGF2 and control uninfected groups transplanted with 800 islets could preclude a valid comparison. Thus, to ensure comparable metabolic conditions among grafts from Ad-IGF2 group and control uninfected group throughout the study, STZ-diabetic recipients were transplanted with 500 islets, a  $\beta$ -cell mass clearly insufficient to restore normoglycemia in this model. As planned, both groups showed similar hyperglycemia throughout the study (Table 1).

**$\beta$ -Cell Replication.** At all time points after transplantation,  $\beta$ -cell replication was higher in grafts of Ad-IGF2 group than in grafts of control uninfected group [day 3: 1.45% (IQR: 0.26) vs. 0.58% (IQR: 0.18),  $p=0.006$ ; day 10: 1.58% (IQR: 1.40) vs. 0.90% (IQR: 0.61),  $p=0.035$ ; day 28: 1.35% (IQR: 0.35) vs. 0.64% (IQR: 0.28),  $p=0.004$ ] and than  $\beta$ -cell replication in normal pancreas [0.36% (IQR: 0.17),  $p<0.02$ ;  $p<0.05$  when it was adjusted for multiple comparisons] (Fig. 3B). Although glucose is a well-known stimulator of  $\beta$ -cell proliferation, in control uninfected group  $\beta$ -cell replication was significantly increased only on day 10 after transplantation, but not on days 3 and 28, compared to normal pancreas, confirming previous observations indicating that  $\beta$ -cell replication is impaired initially after transplantation (5) and after long-term exposure to hyperglycemia (5,46).

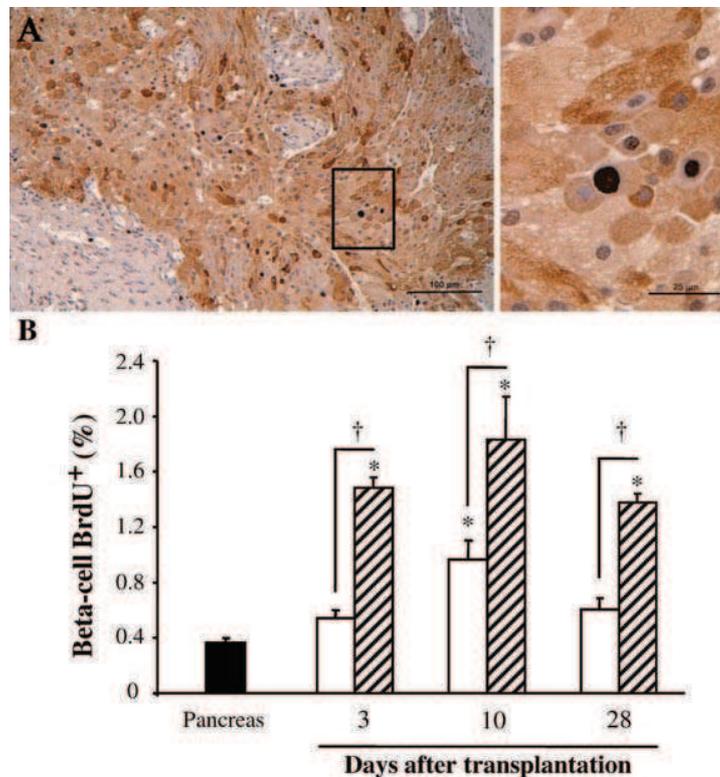
### FACING COLUMN

**Figure 2.** Metabolic evolution of streptozotocin (STZ)-diabetic Lewis rats transplanted with 800 Ad-IGF2 islets (squares), with 800 Ad-luciferase (Luc) islets (triangles), or with 800 control uninfected islets (rhombus) and of nondiabetic nontransplanted animals (crosses). (A) Nonfasting blood glucose. Tx indicates transplantation day, and the arrow indicates the removal of the graft. Values are the mean.  $*p<0.05$  versus nondiabetic nontransplanted animals (Mann–Whitney  $U$  test). After adjusting for multiple comparisons, all differences except day 40, between nondiabetic nontransplanted animals and control uninfected and Ad-Luc groups remained statistically significant. (B) Kaplan–Meier survival curve showing differences in percentage of normoglycemic animals over time among Ad-IGF2 (squares), Ad-Luc (triangles), and uninfected (rhombus) groups (log-rank,  $\chi^2=19.39$ ,  $p=0.0001$ ). The percentage of normoglycemic animals over time differed significantly between Ad-IGF2 group and control uninfected group (log-rank,  $\chi^2=11.48$ ,  $p=0.001$ ) and between Ad-IGF2 group and Ad-Luc group (log-rank,  $\chi^2=11.48$ ,  $p=0.001$ ), but not between the control uninfected and Ad-Luc groups (log-rank,  $\chi^2=0.17$ ,  $p=0.67$ ). Differences remained statistically significant after adjusting for multiple comparisons ( $p<0.005$ ). (C) Intraperitoneal glucose tolerance test. Kruskal–Wallis,  $p<0.05$  among all groups at each time point, Mann–Whitney,  $*p<0.05$  versus all other groups except Ad-IGF2 at time 120.  $\dagger p<0.05$  between Ad-IGF2 group and control uninfected group.  $\#p<0.05$  between Ad-IGF2 group and Ad-Luc group. Differences among transplanted groups were not statistically significant after multiple comparison correction.

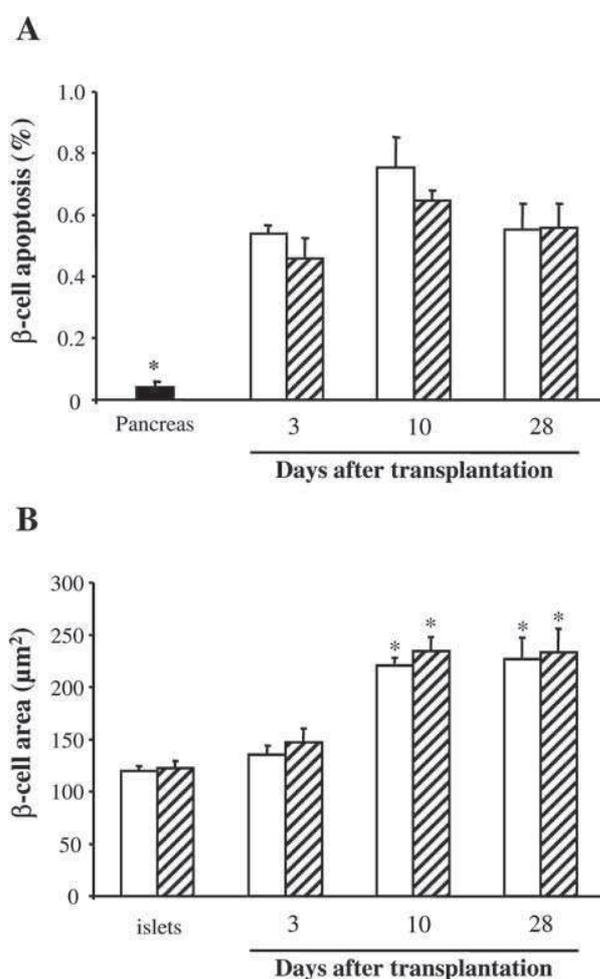
**Table 1.** Blood Glucose and Body Weight in STZ-Diabetic Rats Transplanted With 500 Islets

		STZ	Tx	Days After Transplantation		
				3	10	28
Blood glucose (mmol/L)	Control group	6.0 (1.0)*	31.9 (4.9)†	22.3 (5.2)	23.6 (6.82)	24.5 (3.2)
	Ad-IGF-2 group	5.8 (1.2)*	28.3 (3.6)†	23.2 (2.7)	21.2 (5.1)	20.2 (5.3)
Body weight (g)	Control group	188 (8.0)	199 (7.6)	209 (16.9)	220 (14.8)	248 (12.0)
	Ad-IGF-2 group	187 (13.2)	198 (10.3)	199 (12.4)	214 (21.4)	233 (27.7)

Values are median and interquartile range (shown in parentheses) for six animals in each group. STZ, day of streptozotocin injection; Tx, day of islet transplantation. Kruskal–Wallis,  $p < 0.001$  among different time points in control uninfected group and adenovirus encoding insulin-like growth factor 2 (Ad-IGF2) group; Mann–Whitney, \* $p < 0.01$  compared to all time points, † $p < 0.02$  versus all time points after transplantation. After adjusting for multiple comparisons, all differences, except Tx day versus day 3 in Ad-IGF2 group, remained statistically significant at all time points.



**Figure 3.** (A) Islet graft from Ad-IGF2 group on day 10 after transplantation. Section was double-stained for bromodeoxyuridine (BrdU) (black nuclei, clearly shown in inset) and for insulin (brown cytosolic staining). (B)  $\beta$ -cell replication in normal pancreas (black bar) and in 500-islet grafts from control uninfected (white bars) and Ad-IGF2 (hatched bars) groups. Values are mean  $\pm$  SEM. Kruskal–Wallis,  $p < 0.02$  among control pancreas and control uninfected groups and among control pancreas and Ad-IGF2 groups, Mann–Whitney, \* $p < 0.02$  versus control pancreas. Differences remained significant after adjusting for multiple comparisons ( $p < 0.05$ ). † $p < 0.05$  between control uninfected and Ad-IGF2 groups.

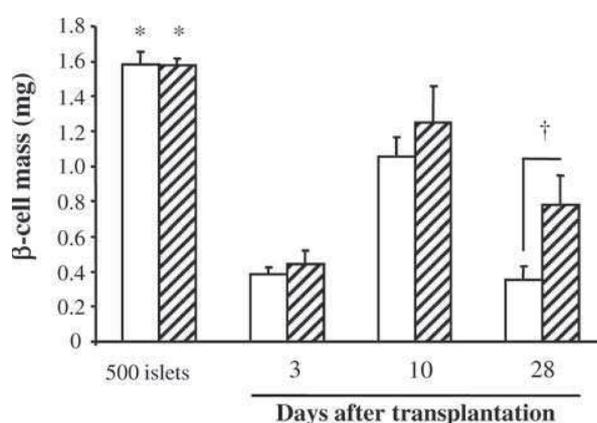


**Figure 4.** (A)  $\beta$ -Cell apoptosis in normal pancreas (black bar) and in 500-islet grafts from control uninfected (white bars) and Ad-IGF2 (hatched bars) groups. Values are mean  $\pm$  SEM. Kruskal–Wallis,  $p < 0.01$  among control pancreas and control uninfected groups and among control pancreas and Ad-IGF2 groups, Mann–Whitney,  $*p < 0.01$  versus all other groups. Differences remained significant after adjusting for multiple comparisons ( $p < 0.05$ ). (B) Cross-sectional area of individual  $\beta$ -cells in isolated islets cultured overnight as for transplantation, and in 500-islet grafts from control uninfected (white bars) and Ad-IGF2 (hatched bars) groups. Values are mean  $\pm$  SEM. Kruskal–Wallis,  $p < 0.002$  among control uninfected groups and among Ad-IGF2 groups, Mann–Whitney,  $*p < 0.01$  versus control uninfected islets and Ad-IGF2-overexpressing islets. Differences remained significant after adjusting for multiple comparisons ( $p < 0.02$ ).

**$\beta$ -Cell Apoptosis.**  $\beta$ -Cell apoptosis was significantly increased in transplanted islets from both control uninfected and Ad-IGF2 groups compared with normal pancreas at all time points ( $p < 0.01$  and  $p < 0.05$  when adjusted for multiple comparisons) (Fig. 4A). There were no differences between Ad-IGF2 and uninfected groups.

**Individual Cross-Sectional  $\beta$ -Cell Size.** The individual cross-sectional area of  $\beta$ -cells increased significantly in islet grafts on days 10 and 28 after transplantation compared with the individual area of  $\beta$ -cells in isolated islets ( $p < 0.01$  and  $p < 0.02$  when adjusted for multiple comparisons) (Fig. 4B). Individual  $\beta$ -cell size was similar in Ad-IGF2 and uninfected groups.

**$\beta$ -Cell Mass.**  $\beta$ -Cell mass was reduced on day 3 after transplantation in control uninfected [0.38 mg (IQR: 0.19)] and Ad-IGF2 [0.36 mg (IQR: 0.26)] groups compared with the initially transplanted  $\beta$ -cell mass [control uninfected: 1.60 mg (IQR: 0.22),  $p = 0.006$ ; Ad-IGF2: 1.61 mg (IQR: 0.15),  $p = 0.006$ ;  $p = 0.018$  in both cases when adjusted for multiple comparisons] (Fig. 5). In Ad-IGF2 group transplanted  $\beta$ -cell mass increased on day 10 to a value similar to the initially transplanted  $\beta$ -cell mass [1.27 mg (IQR: 0.91)], and on day 28 it was higher than that of control uninfected group [0.63 mg (IQR: 0.38) vs. 0.42 mg (IQR: 0.31),  $p = 0.008$ ], reflecting the higher  $\beta$ -cell replication of Ad-IGF2 transplanted islets. In contrast, in control uninfected group, the graft  $\beta$ -cell mass was always lower than the initially transplanted  $\beta$ -cell mass ( $p < 0.02$  and  $p < 0.05$  when adjusted for multiple comparisons). Although it increased transiently on day 10 after transplantation [1.05 mg (IQR: 0.50)], in agreement with the higher  $\beta$ -cell replication and individual  $\beta$ -cell size at this time point, it was reduced again on day 28 when  $\beta$ -cell replication was impaired and could not compensate the increased  $\beta$ -cell apoptosis.



**Figure 5.**  $\beta$ -Cell mass in 500 isolated islets cultured overnight as for transplantation and in 500-islet grafts from control uninfected (white bars) and Ad-IGF2 (hatched bars) transplanted groups. Values are mean  $\pm$  SEM. Kruskal–Wallis,  $p < 0.005$  among control uninfected groups and among Ad-IGF2 groups, Mann–Whitney,  $*p < 0.02$  versus all other groups except Ad-IGF2 on day 10 after transplantation. Differences remained significant after adjusting for multiple comparisons ( $p < 0.05$ ) except between 500 Ad-IGF2 isolated islets and Ad-IGF2 group on day 28 after transplantation.  $\ddagger p < 0.01$  between control uninfected group and Ad-IGF2 group.

## DISCUSSION

In this study, we show that transplanted islets overexpressing IGF2 maintained a sustained increment in  $\beta$ -cell replication that led to the regeneration of the engrafted  $\beta$ -cell mass and to the early achievement of sustained normoglycemia after transplantation to diabetic recipients. IGF2 overexpression did not modify insulin secretion in islets studied *in vitro*, did not reduce  $\beta$ -cell apoptosis, and did not enhance  $\beta$ -cell hypertrophy in transplanted islets, suggesting that the higher  $\beta$ -cell mass and improved metabolic control in IGF2-overexpressing grafts resulted from the increased  $\beta$ -cell replication.

IGF1 and IGF2 are  $\beta$ -cell mitogens, and they also promote  $\beta$ -cell survival. The biological effects of IGF2 are mediated primarily by type 1 IGF receptor, which is abundant on  $\beta$ -cells (14,49). IGF2 can also act through the insulin receptor (39). IGF2 expression is higher in fetal life, but it declines and in rodents is extinguished in most tissues after birth. In contrast, IGF1 expression in fetal life is low and does not rise to adult levels until weaning. In early neonatal life, there is a wave of apoptotic  $\beta$ -cell death (42) that has been linked to the concomitant reduction in IGF2 expression (17,34). In adult islets, incubation of islets with IGF2 improves islet cell viability (13,20,37), and IGF2 survival action has been also shown in rats fed with a low protein diet (36). However, we did not detect a reduction in  $\beta$ -cell apoptosis in islet grafts that overexpressed IGF2. The difficulties of preventing the massive loss of islet tissue, up to 70% of the transplanted  $\beta$ -cell mass, that takes place in the early posttransplant period were recently reviewed (11).  $\beta$ -Cell apoptosis peaks around day 3 after transplantation and plays a major role in this early  $\beta$ -cell death (5,11). The cause of the initial  $\beta$ -cell apoptosis is multifactorial (12), with hypoxia playing a fundamental role (10), and other factors such as anoikis (47), nonspecific inflammation (29,38,46), and hyperglycemia (5,15,26,33) also contributing to islet damage. Several strategies that have successfully increased the long-term outcome of islet transplantation have been, however, unable to increase the initial survival of islets (11). We have also met this difficulty in previous experiments in which we found that the beneficial effects of normoglycemia (25) and IL-1 receptor antagonist protein (46) in the outcome of islet transplantation were not associated with a reduction of early  $\beta$ -cell apoptosis. Robitaille et al. (37) reported that preincubation of encapsulated islets with IGF2 before transplantation increased the percentage of diabetic mice that achieved normoglycemia, but apoptosis was not determined in the islet grafts. The lack of effect of IGF2 on transplanted  $\beta$ -cell survival, along with previous data showing similar negative results with other therapeutic interventions, highlights the difficulty of reducing the initial  $\beta$ -cell death in islet transplantation.

It is unknown whether a multifactorial approach would prove more successful.

IGF2 overexpression resulted in sustained  $\beta$ -cell hyperplasia of transplanted islets that showed throughout the study higher proliferation than uninfected transplanted islets or than endogenous pancreatic islets of normal rats. Although glucose is a very potent stimulator of  $\beta$ -cell proliferation (6), on day 3 after transplantation  $\beta$ -cell replication was not significantly higher in islet grafts of control uninfected group than in islets of normal, non-STZ-injected nontransplanted, control rats, confirming previous data indicating that  $\beta$ -cell replication is impaired in the early days after transplantation (5). The limitation in  $\beta$ -cell replication in the initial days after transplantation is mediated, at least partly, by IL-1 $\beta$ -mediated nonspecific inflammation (29,45). The increased replication on day 3 after transplantation in IGF2-overexpressing grafts suggests that IGF2 is able to partly prevent the suppressive effects of IL-1 $\beta$  on  $\beta$ -cell replication *in vivo* and is in agreement with recently published *in vitro* data (13). On the other hand, glucose-induced  $\beta$ -cell replication is not maintained when islets are exposed to chronic hyperglycemia (5,21,30), as shown in the transplanted islets of control uninfected group exposed to 28 days of sustained hyperglycemia. The increased  $\beta$ -cell replication in Ad-IGF2 group on day 28 after transplantation indicates that IGF2 overexpression was able to overcome this limitation. The mechanism by which IGF2 increased  $\beta$ -cell replication in islets exposed to chronic hyperglycemia remains unknown. As described for IGF1 (53), overexpression of IGF2 in islet cells could increase the expression of insulin receptor substrate 2 (IRS-2), a protein playing a crucial role in  $\beta$ -cell growth.

IGF2 has been reported to inhibit, increase, or have no effect on insulin secretion (9,16,24,55). We found that glucose-stimulated insulin secretion was not modified in Ad-IGF2 islets after 2 and 7 days in culture. This normal insulin secretion in Ad-IGF2 islets suggests that the improved metabolic outcome in rats transplanted with IGF2 overexpressing islets was due to the increased  $\beta$ -cell mass. IGF2 overexpression did not increase the size of individual  $\beta$ -cells in agreement with previous data indicating that IGF2 overexpression in transgenic mice did not induce  $\alpha$ - or  $\beta$ -cell hypertrophy (9). Thus, since IGF2 overexpression did not modify insulin secretion, did not reduce transplanted  $\beta$ -cell death, and did not induce  $\beta$ -cell hypertrophy, we postulate that the increased  $\beta$ -cell mass in islet grafts overexpressing IGF2 and improved the metabolic outcome resulted from the sustained increment of  $\beta$ -cell replication throughout the first month after transplantation.

In clinical islet transplantation, a high islet mass must be transplanted to achieve normoglycemia, typically requiring two or three islet transplant procedures (23,40,44). The

transplantation process results in a dramatic loss of islets leading to the successful engraftment of a  $\beta$ -cell mass that is marginally sufficient to maintain normoglycemia and any subsequent reduction, even from mild insults, may result in the recurrence of hyperglycemia (23). Since the preservation of the initially transplanted  $\beta$ -cell mass has proven to be particularly challenging, an alternative or complementary strategy to increase the grafted  $\beta$ -cell mass would be to enhance the replication of transplanted  $\beta$ -cells. In this study, we have shown that a therapeutic intervention targeting  $\beta$ -cell replication was able to regenerate the transplanted  $\beta$ -cell mass and to improve the outcome of islet transplantation. The use of adenoviral vectors in clinical islet transplantation is unlikely, but it is a useful model to investigate the benefits of local delivery of treatments to islet grafts. The results indicate that overexpression of IGF2 to the islet grafts was beneficial. IGF2 overexpression induced a sustained increment in  $\beta$ -cell replication in transplanted islets, with no changes in  $\beta$ -cell apoptosis or individual cell size, and increased the  $\beta$ -cell mass in the islet graft. The improved metabolic outcome of the diabetic recipients indicates that strategies that increase  $\beta$ -cell replication can increase the grafted  $\beta$ -cell mass and reduce the  $\beta$ -cell number required to achieve normoglycemia.

**ACKNOWLEDGMENTS:** *This work was supported by grants from the Juvenile Diabetes Foundation International (1-2002-687) and Instituto de Salud Carlos III (PI06/0891 and PI10/00636). CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM) is an initiative from ISCIII. Elisabet Estil-les was supported by a grant from Fundació Privada IDIBELL. The authors declare no conflicts of interest.*

## REFERENCES

- Agudo, J.; Salavert, A.; Casellas, A.; Jimenez, V.; Ayuso, E.; Bosch, F. Pancreatic expression of IGF-II increases diabetes susceptibility. *Diabetes* 57 (Suppl1):A441; 2008.
- Asfari, M.; Wei, D.; Noel, M.; Holthuisen, P.E.; Czernichow, P. IGF-II gene expression in a rat insulin-producing  $\beta$ -cell line (INS-1) is regulated by glucose. *Diabetologia* 38:927–935; 1995.
- Barbu, A. R.; Akusjärvi, G.; Welsh, N. Adenoviral-mediated transduction of human pancreatic islets: Importance of adenoviral genome for cell viability and association with a deficient antiviral response. *Endocrinology* 146:2406–2414; 2005.
- Bell, R. C.; Khurana, M.; Ryan, E. A.; Finegood, D. T. Gender differences in the metabolic response to graded numbers of transplanted islets of Langerhans. *Endocrinology* 135:2681–2687; 1994.
- Biarnés, M.; Montolio, M.; Nacher, V.; Raurell, M.; Soler, J.; Montanya, E.  $\beta$ -cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycaemia. *Diabetes* 51:66–72; 2002.
- 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.
- Cornu, M.; Yang, J. Y.; Jaccard, E.; Poussin, C.; Widmann, C.; Thorens, B. Glucagon-like peptide-1 protects against apoptosis by increasing the activity of an IGF-2/Igf-1 receptor autocrine loop. *Diabetes* 58:1816–1825; 2009.
- Davalli, A. M.; Scaglia, L.; Zanger, D. H.; Hollister, J.; Bonner-Weir, S.; Weir, G. C. Vulnerability of islets in the immediate postransplantation period. Dynamic changes in structure and function. *Diabetes* 45:1161–1167; 1996.
- Devedjian, J. C.; George, M.; Casellas, A.; Pujol, A.; Visa, J.; Pelegrin, M.; Gros, L.; Bosch, F. Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor-II in  $\beta$  cells develop type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 105:731–740; 2000.
- Dionne, K. E.; Colton, C. K.; Yarmush, M. L. Effect of hypoxia on insulin secretion by isolated rat and canine islets of Langerhans. *Diabetes* 42:12–21; 1993.
- Emamaullee, J. A.; Shapiro, A. M. J. Interventional strategies to prevent  $\beta$ -cell apoptosis in islet transplantation. *Diabetes* 55:1907–1914; 2006.
- Emamaullee, J. A.; Shapiro, A. M. J. Factors influencing the loss of beta-cell mass in islet transplantation. *Cell Transplant.* 16:1–8; 2007.
- Estil-les, E.; Téllez, N.; Soler, J.; Montanya, E. High sensitivity of beta cell replication to the inhibitory effects of IL-1 $\beta$ . Modulation by adenoviral IGF2 overexpression in rat islets. *J. Endocrinol.* 203:55–63; 2009.
- Fehmann, H. C.; Jehle, P.; Markus, U.; Goke, B. Functional active receptors for insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II on insulin-, glucagon-, and somatostatin-producing cells. *Metabolism* 45:759–766; 1996.
- Ferrer-Garcia, J. C.; Merino-Torres, J. F.; Perez, B. G.; Herrera-Vela, C.; Ponce-Marco, J. L.; Pinon-Selles, F. Insulin-induced normoglycemia reduces islet number needed to achieve normoglycemia after allogeneic islet transplantation in diabetic mice. *Cell Transplant.* 12:849–857; 2003.
- Hill, D. J.; Sedran, R. J.; Brenner, S. L.; McDonald, T. J. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) has a dual effect on insulin release from isolated, perfused adult rat islets of Langerhans. *J. Endocrinol.* 153:15–25; 1997.
- Hill, D. J.; Strutt, B.; Arany, E.; Zaina, S.; Coukell, S.; Graham, C. F. Increased and persistent circulating insulin-like growth factor II in neonatal transgenic mice suppresses developmental apoptosis in the pancreatic islets. *Endocrinology* 141:1151–1157; 2000.
- Hogg, J.; Han, V. K. M.; Clemmons, D. R.; Hill, D. J. Interactions of glucose, insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins in the regulation of DNA synthesis by isolated fetal rat islets of Langerhans. *J. Endocrinol.* 138:401–412; 1993.
- 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.
- Ilieva, A.; Yuan, S.; Wang, R. N.; Agapitos, D.; Hill, D. J.; Rosenberg, L. Pancreatic islet cell survival following islet isolation: The role of cellular interactions in the pancreas. *J. Endocrinol.* 161:181–190; 1999.
- Kaufman, D. B.; Rabe, F.; Platt, J. L.; Stock, P. G.; Sutherland, D. E. R. On the variability of outcome after islet allotransplantation. *Transplantation* 45:1151–1153; 1988.
- Keymeulen, B.; Teng, H.; Vetri, M.; Gorus, F.; Pipeleers, D. G. Effect of donor islet mass on metabolic normalization in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 35:719–724; 1992.
- Korsgren, O.; Lundgren, T.; Felldin, M.; Foss, A.; Isaksson, B.; Permert, J.; Persson, H.; Rafael, E.; Rydén, M.; Salmela, K.; Tibell, A.; Tufveson, G.; Nilsson, B. Optimising islet

- engraftment is critical for successful clinical islet transplantation. *Diabetologia* 51:227–232; 2008.
24. Leahy, L.; Vanderkerkhove, K. M. Insulin-like growth factor 1 at physiological concentrations is a potent inhibitor of insulin secretion. *Endocrinology* 126:1593–1598; 1990.
  25. Merino, J. F.; Nacher, V.; Raurell, M.; Aranda, O.; Soler, J.; Montanya, E. Improved outcome of islet transplantation in insulin-treated diabetic mice: Effects on beta cell mass and function. *Diabetologia* 40:1004–1010; 1997.
  26. Merino, J. F.; Nacher, V.; Raurell, M.; Biarnés, M.; Soler, J.; Montanya, E. Optimal insulin treatment in syngeneic islet transplantation. *Cell Transplant*. 9:11–18; 2000.
  27. Montaña, E.; Bonner-Weir, S.; Weir, G. C. Beta cell mass and growth after syngeneic islet cell transplantation in normal and streptozocin diabetic C57BL/6 mice. *J. Clin. Invest.* 91:780–787; 1993.
  28. Montanya, E.; Téllez, N. Pancreatic remodelling: Beta-cell apoptosis, proliferation and neogenesis, and the measurement of beta-cell mass and of individual beta-cell size. *Methods Mol. Biol.* 560:137–158; 2009.
  29. Montolio, M.; Biarnés, M.; Téllez, N.; Escoriza, J.; Soler, J.; Montanya, E. Interleukin-1beta and inducible form of nitric oxide synthase expression in early syngeneic islet transplantation. *J. Endocrinol.* 192:169–177; 2007.
  30. Nacher, V.; Merino, J. F.; Raurell, M.; Soler, J.; Montanya, E. Normoglycaemia restores beta cell replicative response to glucose in transplanted islets exposed to chronic hyperglycaemia. *Diabetes* 47:192–196; 1998.
  31. Nacher, V.; Raurell, M.; Merino, J. F.; Aranda, O.; Soler, J.; Montanya, E. Beta cell growth and mass are preserved in long-term syngeneic islet transplantation in streptozocin-induced diabetic Lewis rats. *Diabetes* 45:1541–1546; 1996.
  32. Nielsen, J.; Christiansen, J.; Lykke-Andersen, J.; Johnsen, A. H.; Wewer, U. M.; Nielsen, F. C. A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol. Cell. Biol.* 19:1262–1270; 1999.
  33. Pakhomov, O.; Honiger, J.; Gouin, E.; Cariolet, R.; Reach, G.; Darquy, S. Insulin treatment of mice recipients preserves beta-cell function in porcine islet transplantation. *Cell Transplant*. 11:721–728; 2002.
  34. Petrik, J.; Arany, E.; McDonald, T. J.; Hill, D. J. Apoptosis in the pancreatic islet cells of the neonatal rat is associated with a reduced expression of insulin-like growth factor II that may act as a survival factor. *Endocrinology* 139:2994–3004; 1998.
  35. Petrik, J.; Pell, J. M.; Arany, E.; McDonald, T. J.; Dean, W. L.; Reik, W.; Hill, D. J. Overexpression of insulin-like growth factor-II in transgenic mice is associated with pancreatic islet cell hyperplasia. *Endocrinology* 140:2353–2363; 1999.
  36. Petrik, J.; Reusens, B.; Arany, E.; Remacle, C.; Coelho, C.; Hoet, J. J.; Hill, D. J. A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology* 140:4861–4873; 1999.
  37. Robitaille, R.; Dusseault, J.; Henley, N.; Rosenberg, L.; Hallé, J. P. Insulin-like growth factor II allows prolonged blood glucose normalization with reduced islet cell mass transplantation. *Endocrinology* 144:3037–3045; 2003.
  38. Rodríguez-Mulero, S.; Montanya, E. Islet graft response to transplantation injury includes upregulation of protective as well as apoptotic genes. *Cell Transplant*. 17:1025–1034; 2008.
  39. Rother, K. I.; Accili, D. Role of insulin receptors and IGF receptors in growth and development. *Pediatr. Nephrol.* 14:558–561; 2000.
  40. Ryan, E. A.; Paty, B. W.; Senior, P. A.; Bigam, D.; Alfadhli, E.; Kneteman, M. N.; Lakey, J. R. T.; Shapiro, A. M. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54:2060–2069; 2005.
  41. Saxena, R.; Voight, B. F.; Lyssenko, V.; Burt, N. P.; Bakker, P. I. W.; Chen, H.; Roix, J. J.; Kathiresan, S.; Hirschhorn, J. N.; Daly, M. J.; Hughes, T. E.; Groop, L.; Altshuler, D.; Almgren, P.; Florez, J. C.; Meyer, J.; Ardlie, K.; Boström, K. B.; Isomaa, B.; Lettre, G.; Lindblad, U.; Lyon, H. N.; Melander, O.; Newton-Cheh, C.; Nilsson, P.; Orho-Melander, M.; Råstam, L.; Speliotes, E. K.; Taskinen, M.-R.; Tuomi, T.; Guiducci, C.; Berglund, A.; Carlson, J.; Gianniny, L.; Hackett, R.; Hall, L.; Holmkvist, J.; Laurila, E.; Sjögren, M.; Sterner, M.; Surti, A.; Svensson, M.; Svensson, M.; Tewhey, R.; Blumenstiel, B.; Parkin, M.; DeFelicis, M.; Barry, R.; Brodeur, W.; Camarata, J.; Chia, N.; Fava, M.; Gibbons, J.; Handsaker, B.; Healy, C.; Nguyen, K.; Gates, C.; Sougnez, C.; Gage, D.; Nizzari, M.; Gabriel, S. B.; Chim, G. W.; Ma, Q.; Parikh, H.; Richardson, D.; Ricke, D.; Purcell, S. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316:1331–1336; 2007.
  42. Scaglia, L.; Cahill, C. J.; Finegood, D. T.; Bonner-Weir, S. Apoptosis participates in the remodelling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology* 138:1736–1741; 1997.
  43. Scott, L. J.; Mohlke, K. L.; Bonnycastle, L. L.; Willer, C. J.; Li, Y.; Duren, W. L.; Erdos, M. R.; Stringham, H. M.; Chines, P. S.; Jackson, A. U.; Prokunina-Olsson, L.; Ding, C. J.; Swift, A. J.; Narisu, N.; Hu, T.; Pruim, R.; Xiao, R.; Li, X. Y.; Conneely, K. N.; Riebow, N. L.; Sprau, A. G.; Tong, M.; White, P. P.; Hetrick, K. N.; Barnhart, M. W.; Bark, C. W.; Goldstein, J. L.; Watkins, L.; Xiang, F.; Saramies, J.; Buchanan, T. A.; Watanabe, R. M.; Valle, T. T.; Kinnunen, L.; Abecasis, G. R.; Pugh, E. W.; Doheny, K. F.; Bergman, R. N.; Tuomilehto, J.; Collins, F. S.; Boehnke, M. A Genome-wide association study of type 2 diabetes in finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316:1341–1345; 2007.
  44. Shapiro, A. M.; Lakey, J. R.; Ryan, E. A.; Korbut, G. S.; Toth, E.; Warnock, G. L.; Kneteman, N. M.; Rajotte, R. V. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N. Engl. J. Med.* 343:230–238; 2000.
  45. Téllez, N.; Montolio, M.; Biarnés, M.; Castaño, 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.
  46. Téllez, N.; Montolio, M.; Estil-les, E.; Escoriza, J.; Soler, J.; Montanya, E. Adenoviral overproduction of interleukin-1 receptor antagonist increases beta cell replication and mass in syngeneically transplanted islets, and improves metabolic outcome. *Diabetologia* 50:602–611; 2007.
  47. Thomas, F. T.; Contreras, J. L.; Bilbao, G.; Ricordi, C.; Curiel, D.; Thomas, J. M. Anoikis, extracellular matrix, and apoptosis factors in isolated islet transplantation. *Surgery* 126:299–304; 1999.
  48. Tobin, B. W.; Lewis, J. T.; Chen, D. Z. X.; Finegood D. T. Insulin secretory function in relation to transplanted islet mass in STZ-induced diabetic rats. *Diabetes* 42:98–105; 1993.
  49. Van Schravendijk, C. F.; Foriers, A.; Van Den Brande, J. L.; Pipeleers, D. G. Evidence for the presence of type I

- insulin-like growth factor receptors on rat pancreatic A and B cells. *Endocrinology* 121:1784–1788; 1987.
50. Vasavada, R. C.; Gonzalez-Pertusa, J. A.; Fujinaka, Y.; Fiaschi-Taesch, N.; Cozar-Castellano, I.; Garcia-Ocaña, A. Growth factors and beta cell replication. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38:931–950; 2006.
  51. Warnock, G. L.; Rajotte, R. V. Critical mass of purified islets that induce normoglycemia after implantation into dogs. *Diabetes* 37:467–470; 1988.
  52. Weibel, E. R. Point counting methods. In: Weibel, E. R., ed. *Stereological methods*, vol. 1. London, UK: Academic Press; 1979:101–161.
  53. Withers, D. J.; Burks, D. J.; Towery, H. H.; Altamuro, S. L.; Flint, C. L.; White, M. F. *Irs-2* coordinates *Igf-1* receptor mediated  $\beta$ -cell development and peripheral insulin signaling. *Nat. Genet.* 23:32–40; 1999.
  54. Zeggini, E.; Weedon, M. N.; Lindgren, C. M.; Frayling, T. M.; Elliott, K. S.; Lango, H.; Timpson, N. J.; Perry, J. R. B.; Rayner, N. W.; Freathy, R. M.; Barrett, J. C.; Shields, B.; Morris, A. P.; Ellard, S.; Groves, C. J.; Harries, L. W.; Marchini, J. L.; Owen, K. R.; Knight, B.; Cardon, L. R.; Walker, M.; Hitman, G. A.; Morris, A. D.; Doney, A. S. F.; The Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), McCarthy, M. I.; Hattersley, A. T. Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316:1336–1341; 2007.
  55. Zhang, Q.; Tally, M.; Larsson, O.; Kennedy, R. T.; Huang, L.; Hall, K.; Berggren, P. O. Insulin-like growth factor II signaling through the IGF-II/M-6P receptor promotes exocytosis in insulin-secreting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:6232–6237; 1997.



**DISCUSSIÓ**



En aquest projecte s'han estudiat els efectes d'IGF2 sobre la supervivència i la regeneració de les cèl·lules beta pancreàtiques utilitzant un model de sobreexpressió per adenovirus. *In vitro* s'ha demostrat que la sobreexpressió d'IGF2 en les cèl·lules de l'illot confereix una protecció parcial sobre el profund efecte inhibitori de la replicació de les cèl·lules beta induït per la IL-1 $\beta$ , evita la producció de NO i protegeix de l'apoptosi induïts per la citocina. *In vivo* s'ha determinat que els illots que sobreexpressen IGF2 trasplantats singènicament a rates diabètiques per estreptozotocina mostren un increment sostingut de la replicació de les cèl·lules beta que condueix a la regeneració de la massa beta trasplantada i permet assolir la normoglicèmia de manera ràpida i mantinguda als receptors diabètics. En conjunt, doncs, els resultats obtinguts suggereixen que el disseny d'estratègies basades en estimular la replicació beta poden ser beneficiosos en la diabetis i el trasplantament d'illots.

La sobreexpressió d'IGF2 en els illots pancreàtics es va induir mitjançant la infecció dels illots amb un vector adenoviral. A les 48h de la infecció amb  $7 \times 10^7$  pfu de l'adenovirus que codifica per la proteïna verda fluorescent (Ad-GFP), el 100% dels illots i el 29% de les cèl·lules de l'illot expressaven el transgen. Aquesta eficiència de la infecció ens va permetre assolir uns nivells d'expressió d'IGF2 en els illots infectats suficients per poder demostrar els efectes beneficiosos sense alterar la viabilitat, la funció ni la replicació de les cèl·lules beta dels illots. Existeix certa controvèrsia pel que fa als nivells d'infecció que s'assoleixen amb l'ús d'adenovirus com a vectors de transferència. Molts autors descriuen només el percentatge d'illots infectats (100% en el nostre cas), però no el percentatge de cèl·lules individuals de l'illot infectades, valor que requereix una anàlisi més detallada. En el nostre estudi vam analitzar l'eficiència de la infecció per citometria de flux per determinar el percentatge de cèl·lules de l'illot que expressaven la GFP, per microscòpia confocal per identificar la distribució de les cèl·lules infectades i per immunohistoquímica per confirmar l'expressió del gen d'interès. Els valors d'infecció de les cèl·lules individuals assolits en el nostre treball, el 20% a les 24 hores després de la infecció i el 29% passades 48 hores, es troben dins els límits descrits en la literatura quan parlem d'infecció adenoviral d'illots sencers (Barbu et al., 2005; Benhamou et al., 1997; Diraison et al., 2004; Piston et al., 1999; Téllez et al., 2005; Weber et al., 1997). En general, taxes d'infecció molt més altes (d'entre el 70-80%) s'han reportat si els illots es dispersen en cèl·lules individuals prèviament a la infecció. En definitiva, la taxa d'infecció assolida en el nostre estudi permet una expressió d'IGF2 sense els possibles efectes nocius que porta intrínsicament la infecció amb adenovirus (Barbu et al., 2005). La major part de les cèl·lules infectades es situaven a la

perifèria de d'illot, com ja ha estat descrit (Becker et al., 1994a; Muruve et al., 1997), i per tant es tracta probablement en la seva major part de cèl·lules endocrines no beta, en particular cèl·lules alfa. Cal tenir en compte però que la proteïna IGF2 es secreta, i en conseqüència exerceix els seus efectes no només de forma autocrina, sobre la cèl·lula infectada que l'expressa, sinó que també té un efecte paracrí, sobre les cèl·lules veïnes. Es pot pensar que donada la diferent distribució dels tipus de cèl·lules endocrines en els illots de rosegadors i els illots humans, en els quals les cèl·lules alfa i les cèl·lules beta es troben disperses per tot l'illot, aquest fet podria augmentar el nombre de cèl·lules beta infectades en els illots humans. No obstant això, l'efecte paracrí d'IGF2 redueix la importància del tipus específic de cèl·lula endocrina que esdevé infectada per l'adenovirus, si bé una major distribució de la infecció en les cèl·lules de l'interior de l'illot podria ser més eficaç.

Els experiments *in vitro* realitzats en aquest treball es van dirigir, d'una banda, a investigar l'efecte de la citocina proinflamatòria IL-1 $\beta$  sobre la viabilitat, la funció i la regeneració beta, donada la importància de la citocina en el desenvolupament de la diabetis i la toxicitat que exerceix sobre les cèl·lules beta pancreàtiques, i de l'altra, a determinar el possible rol beneficiós d'IGF2 sobre la supervivència i la replicació cel·lular beta. A més, com que la inducció de la proliferació de les cèl·lules beta pels IGFs és dependent de la concentració de glucosa del medi (Hügl et al., 1998), vam utilitzar baixa i alta de glucosa per definir millor els efectes de la IL-1 $\beta$  i de l'IGF2 sobre la replicació beta.

Està ben establert que la IL-1 $\beta$  sola o en combinació amb altres citocines proinflamatòries com l'interferó- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) i el factor de necrosi tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), indueix la mort de les cèl·lules beta en illots de ratolí, de rata i en illots humans (Eizirik and Mandrup-Poulsen, 2001; Mathis et al., 2001; Saldeen, 2000). També està acceptat que els illots de les diferents espècies (ratolí, rata i humana) presenten diferents graus de susceptibilitat a aquestes citocines, sent els illots de ratolí els més resistents i els de rata els més sensibles (Kawahara and Kenney, 1991). La IL-1 $\beta$  també exerceix un efecte inhibidor sobre la replicació de les cèl·lules beta (Eizirik et al., 1990; Maedler et al., 2001; Sjöholm, 1991; Southern et al., 1990b; Téllez et al., 2005), ara bé, aquest rol de la IL-1 $\beta$  sobre la proliferació cel·lular beta ha rebut menys atenció i està menys ben definit. En el nostre grup vam identificar en un model de trasplantament d'illots singènic un augment de l'expressió del gen de la IL-1 $\beta$  i d'iNOs en els empelts els primers dies després del trasplantament (Montolio et al., 2007a; Montolio et al., 2007b) i vam determinar que la

sobreexpressió de l'antagonista del receptor de la IL-1 en illots de rata provocava un augment de la replicació i de la massa de cèl·lules beta (Télez et al., 2007), el que suggeria que la inhibició de la replicació de les cèl·lules beta per la IL-1 $\beta$  és rellevant en la reducció de la massa de cèl·lules beta.

En base a aquests coneixements, en els experiments *in vitro* realitzats en aquest estudi es van cultivat els illots pancreàtics en presència de diferents concentracions d'IL-1 $\beta$ , i es va poder determinar el doble efecte que exerceix la citocina sobre la biologia beta, per una banda provocant un profund efecte inhibitori de la replicació beta i per l'altra augmentant el nombre de cèl·lules que entren en apoptosi.

Vam observar que la replicació de les cèl·lules beta es trobava augmentada en els illots exposats a molt baixa concentració d'IL-1 $\beta$  (1 U/ml) i pel contrari, estava dràsticament reduïda quan els illots s'incubaven a concentracions més elevades de la citocina. Aquest efecte mitogènic observat a molt baixes concentracions d'IL-1 $\beta$  és concordant amb resultats obtinguts en illots humans, on aquesta acció beneficiosa de les baixes concentracions de la citocina podria reflectir un paper fisiològic de la IL-1 $\beta$  sobre les cèl·lules de l'illot (Maedler et al., 2006a). En contrast, concentracions superiors d'IL-1 $\beta$  van promoure un efecte clarament deleteri, induint una forta inhibició de la replicació de les cèl·lules beta. La supressió de la replicació de les cèl·lules beta es va detectar a concentracions d'IL-1 $\beta$  que eren insuficients per induir-ne l'apoptosi, indicant una alta sensibilitat de la proliferació de les cèl·lules beta a la IL-1 $\beta$ . La IL-1 $\beta$  va reduir la replicació dels illots exposats a 10, 30 i 50 U/ml, tant a baixa com alta glucosa. En els illots de rata exposats a 10 U/ml d'IL-1 $\beta$  la replicació de les cèl·lules beta va disminuir substancialment, i es va suprimir gairebé completament en els illots exposats a 30 i 50 U/ml d'IL-1 $\beta$ . En contrast, la IL-1 $\beta$  va augmentar l'apoptosi de les cèl·lules beta de forma dosi dependent, tant en els illots cultivats a altes com a baixes concentracions de glucosa, però va ser superior en les cèl·lules beta dels illots cultivats a baixa glucosa, que presentaven un augment significatiu de l'apoptosi quan es van exposar a 10U/ml d'IL-1 $\beta$ , en les cèl·lules beta dels illots cultivats a alta glucosa van ser necessàries 30 i 50 U/ml d'IL-1 $\beta$  per augmentar-ne l'apoptosi de manera consistent. Aquests resultats posen de manifest que la replicació de les cèl·lules beta resulta més vulnerable als efectes deleteris de la IL-1 $\beta$  que l'increment de l'apoptosi induït per la citocina.

Els efectes del factor de creixement similar a la insulina II (IGF2) com a mitògen, regulador del creixement i promotor de la proliferació i la supervivència cel·lular suggereixen que pot tenir un paper beneficiós sobre les cèl·lules beta, pel que ens vam proposar caracteritzar els efectes de la sobreexpressió d'IGF2 sobre la replicació, la supervivència i la funció cel·lular beta.

En absència d'IL-1 $\beta$ , la sobreexpressió d'IGF2 va doblar la replicació de les cèl·lules beta tant en els illots cultivats a baixes com a altes concentracions de glucosa i va exercir un efecte protector sobre la replicació en els illots exposats a 10 U/ml d'IL-1 $\beta$ , que van mantenir uns nivells de proliferació beta similars als dels illots control no exposats a la citocina d'acord amb els ben coneguts efectes mitògenics d'IGF2 (Asfari et al., 1995; Hogg et al., 1993; Petrik et al., 1999a). No obstant això la IL-1 $\beta$  també va suprimir la replicació de les cèl·lules beta en els illots que sobreexpressaven IGF2 exposats a altes concentracions de la citocina (30 i 50 U/ml), cultivats en ambdues concentracions de glucosa. Així doncs, la sobreexpressió IGF2 en els illots exposats a IL-1 $\beta$  va induir a una preservació de la proliferació de les cèl·lules beta modesta.

Els efectes de la glucosa sobre la supervivència de les cèl·lules beta són dependents de la concentració, la durada de l'exposició i el fons genètic. *In vitro*, l'alta glucosa promou la supervivència de les cèl·lules beta aïllades de rata (Hoorens et al., 1996), però també indueix l'apoptosi en illots d'animals propensos a patir diabetis (Donath et al., 1999), així com en illots humans (Maedler et al., 2001). *In vivo*, resultats previs del nostre grup van demostrar que es dona un augment de l'apoptosi de les cèl·lules beta en els illots de ratolí trasplantats exposats a hiperglucèmia crònica (Biarnés et al., 2002). Els efectes de la glucosa sobre l'apoptosi induïda per IL-1 $\beta$  no estan ben establerts, i malgrat haver-se descrit que les concentracions elevades de glucosa amplifiquen el dany cel·lular en illots exposats a IL-1 $\beta$  (Spinas et al., 1988), existeixen estudis en que no es van identificar efectes de la glucosa sobre l'apoptosi induïda per IL-1 $\beta$  en les cèl·lules beta (Raile et al., 2003; Téllez et al., 2005).

En el nostre estudi, la utilització de diverses concentracions d'IL-1 $\beta$  ens ha permès identificar l'acció protectora de la glucosa sobre l'apoptosi induïda per IL-1 $\beta$ . En absència d'IL-1 $\beta$  l'apoptosi de les cèl·lules beta va ser similar tant en els illots incubats a altes com a baixes concentracions de glucosa. No obstant això, quan els illots es van exposar a 10 U/ml d'IL-1 $\beta$ , l'apoptosi de les cèl·lules beta va incrementar en els illots cultivats a baixa (5,5 mmol / l), però no a alta (22,2 mmol / l) glucosa, el que suggereix que la glucosa té un efecte afavoridor de la supervivència.

La sobreexpressió IGF2 en els illots va presentar una clara acció antiapoptòtica. En tots els grups que van presentar un augment de l'apoptosi induïda per IL-1 $\beta$  la sobreexpressió d'IGF2 va reduir l'apoptosi de les cèl·lules beta, pel que van ser necessàries concentracions superiors de la citocina per induir un augment significatiu de l'apoptosi respecte els illots control.

L'efecte protector de la glucosa es va confirmar en els illots que sobreexpressaven IGF2 exposats a 30 U/ml d'IL-1 $\beta$  que van mostrar un increment de l'apoptosi de les cèl·lules beta només quan es van cultivar a baixa glucosa. En contrast, tot i el ben establert efecte proliferatiu de la glucosa en les cèl·lules beta (Lingohr et al., 2006; Swenne, 1982) aquesta no va modular l'efecte inhibitori de la IL-1 $\beta$  sobre la replicació de les cèl·lules beta, proporcionant-nos una indicació addicional de l'alta sensibilitat de la replicació de les cèl·lules beta als efectes deleteris de la citocina.

Un altre dels efectes deleteris de la IL-1 $\beta$  és la inhibició que exerceix sobre la secreció d'insulina de les cèl·lules beta, efecte que esta ben establert i s'ha estudiat en detall (Eizirik et al., 1988; Scarim et al., 1997). Pel que fa a les accions d'IGF2 sobre la funció beta existeixen dades controvertides, s'ha descrit tant que pot inhibir, com augmentar o inclús no tenir cap efecte sobre la secreció d'insulina (Devedjian et al., 2000; Hill et al., 1997; Leahy and Vandekerkhove, 1990; Zhang et al., 1997). En el nostre estudi vam observar que la secreció d'insulina estimulada per glucosa no es modificava en els illots que sobreexpressaven IGF2 després de 2 i 7 dies de cultiu.

Els nostres experiments han confirmat la profunda inhibició de la funció de les cèl·lules beta induïda per la IL-1 $\beta$ , i hem trobat una protecció limitada en els illots infectats amb Ad-IGF2. Alguns estudis han demostrat un paper per a la insulina en la replicació i el manteniment de la massa de cèl·lules beta adultes (Okada et al., 2007). En els nostres resultats, encara que la sobreexpressió d'IGF2 va conservar parcialment la secreció de la insulina en els illots exposats a altes concentracions d'IL-1 $\beta$ , la replicació de les cèl·lules beta es va mantenir totalment suprimida.

Diversos dels efectes deleteris de la IL-1 $\beta$  sobre els illots de rosegadors estan mitjançats per l'òxid nítric (NO) (Darville and Eizirik, 1998) el qual és produït per la forma induïble de l'òxid nítric sintasa (iNOS). La interacció de la IL-1 $\beta$  amb el seu receptor tipus 1 (IL-1R1) en les cèl·lules beta activa la senyalització intracel·lular d'IL-1 $\beta$  i dona com a resultat l'expressió de diversos

mediadors entre els quals trobem l'iNOS que genera òxid nítric al catalitzar l'oxidació de la L-Arginina a L-citrulina. Concentracions elevades d'òxid nítric en les cèl·lules beta provoquen diversos processos bioquímics que finalitzen en la inducció de la mort cel·lular beta, ja sigui per apoptosi o per necrosi. Els nivells d'òxid nítric en l'espai intercel·lular dels illots exposats a IL-1 $\beta$  podrien ser sensiblement més elevats respecte els nivells que s'assoleixen en un cultiu de cèl·lules beta en monocapa, el que podria explicar els importants efectes deleteris de la IL-1 $\beta$  sobre les cèl·lules beta dels illots. Els resultats del nostre estudi van mostrar que en els illots exposats a IL-1 $\beta$ , la producció de NO era menor en els illots que sobreexpressaven IGF2 respecte els illots control no infectats, el que suggereix que la protecció que ofereix IGF2 es produeix, al menys en part, per la inhibició de l'expressió d'iNOS. Aquests resultats són concordants amb l'observació que el pic d'apoptosi neonatal que pateixen els illots coincideix amb la disminució dels nivells d'IGF2 i amb l'augment dels nivells d'iNOS, el que suggereix que l'IGF2 té un efecte inhibidor sobre la formació de NO (Hill et al., 1998). Cal esmentar, que els events que porten a un augment de l'expressió d'iNOs i a l'increment de la incidència de l'apoptosi en aquest moment no són ben coneguts, però coincideixen temporalment amb la infiltració dels illots per cèl·lules T que es dona durant l'ontogènia del pàncrees de ratolí. És possible doncs, que la colonització dels illots amb monòcits, macròfags o cèl·lules T en la vida postnatal primerenca porti a un augment en la concentració local de citocines, les quals condueixin en una disminució de les cèl·lules beta a través de l'apoptosi. Ara bé, possiblement aquests esdeveniments requereixin també de la disminució de factors de supervivència beta, com és la reducció de la disponibilitat local d'IGF2. A més, IGF2 pot activar el receptor d'IGF1, i s'ha demostrat que la via de senyalització del receptor d'IGF1 disminueix la formació de NO induïda per IL-1 $\beta$  mitjançant la inhibició de l'expressió i la síntesi d'iNOS en illots de rosegador (Castrillo et al., 2000; Mabley et al., 1997) i inhibeix la producció de NO induïda per la IL-1 $\beta$  en illots humans, així com la disfunció i l'apoptosi de les cèl·lules beta (Giannoukakis et al., 2000).

En conjunt, hem demostrat que la IL-1 $\beta$  va exercir un profund efecte inhibitori sobre la replicació de les cèl·lules beta, n'augmentà l'apoptosi de manera dosi-dependent i en suprimí la funció beta. La sobreexpressió d'IGF2 va preservar la replicació de les cèl·lules beta només en els illots exposats a 10 U/ml IL-1 $\beta$ , i no va tenir efectes sobre la supressió de la proliferació de les cèl·lules dels illots exposats a 30 o 50 U/ml IL-1 $\beta$ . IGF2 va exercir una clara acció anti-apoptòtica en els illots exposats a la citocina i va preservar-ne parcialment la secreció

d'insulina. Per tant, el conjunt de resultats obtinguts *in vitro* ens suggereixen que la replicació de les cèl·lules beta és més sensible als efectes deleteris de la IL-1 $\beta$  que la inducció de l'apoptosi.

El paper de la IL-1 $\beta$  en el desenvolupament de la diabetis tipus 1 està àmpliament acceptat, tant a nivell del sistema immune com a nivell de les cèl·lules beta (Eizirik and Mandrup-Poulsen, 2001; Rabinovitch and Suarez-Pinzon, 2003). La IL-1 $\beta$  també pot ser important en altres processos on es dona disfunció de les cèl·lules beta com la diabetis tipus 2 i el trasplantament d'illots. En condicions normals, la massa de cèl·lules beta es manté per un equilibri entre la regeneració i la mort cel·lular i diversos estudis han demostrat que la cèl·lules beta de rosegador tenen un important potencial de regeneració, capaç de compensar reduccions greus en la massa beta (Dor et al., 2004; Nir et al., 2007), tot i que aquest potencial podria ser més limitat en els humans (Parnaud et al., 2008). El fort efecte inhibitori de la IL-1 $\beta$  sobre la replicació de les cèl·lules beta que hem demostrat suggereix que l'alteració de la replicació de les cèl·lules beta pot ser important en la pèrdua de massa beta en la diabetis. La supressió de la replicació de les cèl·lules beta podria inhibir la resposta regenerativa necessària per compensar la reducció de la massa beta induïda per l'augment de la mort de les cèl·lules beta. El fet que la replicació de les cèl·lules beta no es trobi incrementada en pacients diabètics tipus 1 de recent aparició podria donar suport a aquesta hipòtesi (Butler et al., 2007). Hipotèticament la supressió de la replicació de les cèl·lules beta per la IL-1  $\beta$  podria impedir la renovació i reduir la massa beta, fins i tot en absència d'un augment de l'apoptosi de les cèl·lules beta.

Els efectes beneficiosos de la sobreexpressió adenoviral d'IGF2 identificats *in vitro* ens van proporcionar la base per a estudiar aquests efectes *in vivo* en un model experimental de trasplantament d'illots, una condició on l'augment dels nivells d'IL-1 $\beta$  en l'empelt durant els primers dies després del trasplantament té un paper deleteri important en la supervivència de les cèl·lules beta trasplantades (Montolio et al., 2007a). A més, la sobreexpressió mitjançant adenovirus és una tècnica útil per avaluar els efectes derivats d'una administració local i transitòria de proteïnes amb potencial acció terapèutica, el que resulta particularment interessant en el trasplantament d'illots, on l'expressió de proteïnes amb acció terapèutica en l'empelt podria tenir efectes beneficiosos evitant la toxicitat no desitjada associada amb l'administració sistèmica. Ara bé, en l'actualitat, malgrat els importants avenços en el camp de

la teràpia gènica, és poc probable l'ús de vectors adenovirals per la millora del trasplantament clínic d'illots.

Fa 25 anys es va aprovar el primer assaig clínic per la inserció d'un gen exogen en humans. En aquell moment la teràpia gènica es va considerar un tractament revolucionari per la cura de malalties causades per la mutació o delació d'un gen concret. Des de la dècada dels 80 fins a finals dels 90 es van tractar més de 3000 pacients amb teràpia gènica, però la manca de coneixement sobre certes limitacions que presentava la tècnica, com la resposta immunològica o la regulació gènica, van fer caure les grans expectatives generades en la teràpia gènica pel tractament en humans. El 1999 va saltar l'alarma a Estats Units amb la mort d'un pacient que va sucumbir a la reacció immunològica causada per l'administració de grans dosis de vectors adenovirals. A França, pocs anys després, els retrovirus utilitzats pel tractament de malalts amb immunodeficiències hereditàries van causar dos casos de leucèmia entre els pacients. Com a conseqüència, el 2003 es van suspendre una trentena d'assaig clínics a Estats Units.

Una dècada més tard s'ha aprofundit en el coneixement dels vectors virals i en l'actualitat els virus d'última generació no augmenten la incidència de tumors. A més, les seqüències reguladores utilitzades són més dèbils per evitar l'activació de gens nocius. Aquests nous vectors derivats dels adenovirus i lentivirus s'han utilitzat en alguns dels assaig que avui renoven les expectatives clíniques en la teràpia gènica, malgrat encara quedin alguns problemes per resoldre, com són assegurar al 100% la inserció de la informació genètica exògena en el lloc desitjat, per evitar la disrupció de regions codificants o la introducció en zones properes a oncògens que podrien ser activats.

En estudis preclínic s'ha demostrat que la transferència mitjançant vectors adeno-associats permeten l'expressió a llarg termini del gen exogen introduït en models animals petits i grans (Mingozzi and High, 2011) i recentment algunes de les dades preclíniques s'han traduït amb èxit en éssers humans, a tall d'exemple trobem els estudis clínics de l'hemofília B (Nathwani et al., 2011) i l'amaurosi congènita de Leber (Maguire et al., 2009).

El novembre de 2012 va ser aprovat per l'Agència Europea del Medicament el primer fàrmac comercial per teràpia gènica dirigit al tractament de la deficiència de la lipoproteïna lipasa (LPLD), una malaltia hereditària rara. El Glybera® introdueix el gen de la LPL a través d'un vector derivat d'un virus adeno-associat. L'aprovació s'ha fet "sota circumstàncies excepcionals" per tant, s'aprova únicament per un determinat grup de pacients amb afecció

greu de LPLD, entenent que no és possible, donat que es tracta d'una malaltia rara, obtenir més informació a través d'assaigs clínics. Per tant, encara que persisteixen dubtes sobre la seva eficàcia i seguretat, l'aprovació d'un fàrmac genètic obre les portes per la seva regulació legal en el món.

En el camp de la diabetis cal destacar el treball recent del grup de Bosch, que ha aconseguit la correcció de la diabetis experimental a llarg termini en un model animal gran mitjançant la teràpia gènica. L'administració intramuscular de vectors adeno-associats, codificants pel gen de la glucoquinasa i la insulina, a gossos diabètics per STZ i al·loxà, va donar com a resultat la normalització de la glucèmia en dejú i l'eliminació accelerada de la glucosa després de la carrega oral (Callejas et al., 2013).

Pel que fa als adenovirus utilitzats en aquest treball, cal mencionar que, al marge dels seus potencials usos terapèutics, representen un model útil per investigar els beneficis de l'administració local de tractaments als illots trasplantats i són valuoses eines experimentals per la manipulació genètica de les cèl·lules de l'illot. Els adenovirus presenten avantatges importants respecte altres vectors com són una bona eficiència de la infecció tant en cèl·lules quiescents com en cèl·lules en divisió. Considerant que l'elecció del vector d'expressió per realitzar la transferència gènica de les cèl·lules beta ve condicionada pel fet que es tracta d'un tipus cel·lular altament diferenciat amb una taxa de proliferació molt baixa, d'entre el 0.4 i el 2% depenent de l'espècie, i que l'ús dels vectors adenovirals per la infecció de les cèl·lules beta ha estat àmpliament utilitzat tant en estudis *in vitro* com *in vivo*, els adenovirus resultaven clarament apropiats pel nostre estudi. A més, s'ha comprovat que els empelts d'illots infectats amb adenovirus no presenten infiltració limfocitària (Garcia-Ocana et al., 2003). En el nostre treball tampoc hem observat infiltració limfocitària en els empelts d'illots, indicant que la càrrega viral i el procés d'infecció *ex vivo* utilitzats no desencadenen una resposta immunològica que portaria a la fallada del trasplantament. D'altra banda, el fet que el DNA introduït resti episomal elimina la possibilitat d'alteracions gèniques de la cèl·lula hoste per la inserció del material genètic exogen. Per últim, l'expressió transitòria del gen introduït que ens aporten els adenovirus com a vectors d'expressió també resulta adient pels experiments realitzats, ja que s'ha demostrat que en els illots infectats amb adenovirus l'expressió del transgen i les proteïnes víriques es manté fins a 20 setmanes després del trasplantament

(Muruve et al., 1997). D'acord amb aquestes dades, en el nostre treball hem comprovat que l'expressió d'IGF2 es manté després de 28 dies del trasplantament.

El trasplantament d'illots és una teràpia emergent pel tractament de la diabetis tipus 1, però malgrat oferir avantatges respecte el tractament amb insulina o el trasplantament de pàncrees sencer, topa amb limitacions. La més important és la manca de teixit disponible per trasplantar. Aquesta escassetat s'agreuja amb la pèrdua de teixit cel·lular beta que té lloc durant els primers dies després del trasplantament (Biarnés et al., 2002; Davalli et al., 1996) . La nostra hipòtesi de treball, reforçada pels resultats obtinguts en el nostre estudi *in vitro*, fou que la sobreexpressió d'IGF2 podria millorar el pronòstic del trasplantament mitjançant l'increment o el manteniment de la massa beta.

Com s'ha mencionat anteriorment, IGF1 i IGF2 són factors de creixement que actuen com a potents mitògens cel·lulars i promouen la proliferació i la supervivència de les cèl·lules beta. Així doncs, els experiments *in vivo* es van realitzar per a determinar els possibles efectes beneficiosos de la sobreexpressió d'IGF2 sobre les cèl·lules beta trasplantades i el control metabòlic de la diabetis dels animals receptors del trasplantament.

Vam observar que els illots trasplantats que sobreexpressaven IGF2 presentaven un augment de la proliferació de les cèl·lules beta, un increment de la massa beta i una millora del pronòstic del trasplantament. D'altra banda l'apoptosi i el grau d'hipertròfia de les cèl·lules beta no es trobaven modificades per la sobreexpressió d'IGF2.

Malgrat les diverses evidències de l'acció d'IGF2 com a factor de supervivència, en el nostre treball no hem detectat una reducció significativa de l'apoptosi de les cèl·lules beta dels illots trasplantats que sobreexpressen IGF2. En aquest sentit, cal fer èmfasi en les importants dificultats de la prevenció de la pèrdua de teixit insular trasplantat, fins el 70% de la massa beta, que té lloc els primers dies després del trasplantament, revisat a (Emamallee and Shapiro, 2006). En aquesta mort cel·lular beta primerenca hi juga un paper important el pic apoptòtic que es dona al voltant del dia 3 després del trasplantament (Biarnés et al., 2002; Emamallee and Shapiro, 2006). La causa d'aquesta apoptosi inicial que pateixen les cèl·lules beta és multifactorial (Emamallee and Shapiro, 2007), d'entre els diversos factors que hi participen la hipòxia hi té un paper fonamental (Dionne et al., 1993), però també contribueixen

de manera important al dany insular altres factors com l'anoikis (Thomas et al., 1999), la inflamació inespecífica (Montolio et al., 2007a; Rodríguez-Mulero and Montanya, 2008; Téllez et al., 2007) i la hiperglucèmia (Biarnés et al., 2002; Ferrer-Garcia et al., 2003; Merino et al.; Pakhomov et al., 2002).

Els diversos factors inductors d'apoptosi presents en aquest escenari són resultat no únicament del procés de trasplantament sinó que també són deguts a l'estrès prèviament sofert durant la fase d'aïllament dels illots pancreàtics. L'aïllament és un procés agressiu, on els illots pancreàtics són separats de la seva matriu extracel·lular. Aquest fet implica el trencament d'unions cel·lulars importants per a la supervivència de les cèl·lules, situació que indueix un tipus de mort programada que es coneix com anoikis. En aquest sentit Iliava et al. van descriure l'existència d'una interacció tròfica entre l'epiteli ductal pancreàtic i les cèl·lules de l'illot. Aquesta interacció estaria mitjançada per la secreció ductal d'IGF2 que promouria una reducció significativa de la mort de les cèl·lules de l'illot (Iliava et al., 1999). Per tant, la manca d'aquests senyals a causa del trencament de les interaccions cel·lulars en el pàncrees degut al procés d'aïllament resultaria en l'increment de la mort observada en el període immediatament posterior a l'aïllament i consegüentment en la pèrdua de teixit beta els primers dies post-trasplantament.

El procés d'aïllament també provoca que durant la digestió del pàncrees les connexions vasculars es trenquin i només algunes cèl·lules endotelials romanguin dins dels illots. És ben conegut que les cèl·lules endotelials secreten factors de creixement i citocines, els quals poden contribuir a processos d'angiogènesi, però també de mort cel·lular. D'altra banda cal remarcar que els illots pancreàtics estan molt ben vascularitzats, i tot i que només representen entre l'1-2% de la massa de cèl·lules pancreàtiques, reben del 5-10% del flux de la sang del pàncrees. L'extensa i densa angioarquitectura de l'illot, amb una complexa xarxa de capil·lars altament fenestrats, garanteix un subministrament òptim d'oxigen i nutrients a les cèl·lules dels illots, així com l'arribada de senyals provinents d'altres cèl·lules de l'organisme i la distribució de les hormones secretades. Quan els agregats d'illots avasculats són trasplantats es troben en situació d'hipòxia i depenen de l'oxigen i la difusió de nutrients des del medi intersticial fins que la xarxa vascular no es restableix. Tanmateix, l'angiogènesi no s'inicia fins el segon-quart dia després del trasplantament d'illots, quan té lloc l'estimulació de la proliferació de les cèl·lules endotelials, i no és fins el dia 10-14 post-trasplantament que els empelts d'illots

semblen estar revascularitzats (Andersson et al., 1989). La hipòxia a la que estan sotmesos els illots durant els primers dies després del trasplantament, quan aquests encara no estan vascularitzats, també estarà jugant un rol important en l'increment de l'apoptosi de les cèl·lules beta trasplantades.

El procés inflamatori que té lloc immediatament després del trasplantament també contribueix a l'augment de la mort cel·lular beta primerenca. En aquest procés hi intervenen diversos mediadors proinflamatoris. La IL-1, la IL-6, el TNF- $\alpha$ , l'iNOS, etc. que són presents en els empelts dels illots trasplantats els primers dies després del trasplantament (Montolio et al., 2007b), i que són tòxics per la cèl·lula beta, podrien estar implicats en la destrucció primerenca de les cèl·lules beta post-trasplantament. En el nostre grup hem descrit un augment de l'expressió del gen de la IL-1 $\beta$  i d'iNOS en els empelts d'illots singènics els primers dies després del trasplantament (Montolio et al., 2007a; Montolio et al., 2007b) i és important recordar que en el model singènic es pot excloure el rebuig com a causa d'aquesta inflamació. Aquests resultats, conjuntament amb els obtinguts per Ozasa *et al.* (Ozasa et al., 1997) en que confirmen un augment de l'expressió d'IL-1 $\beta$  en empelts d'illots tant al·logènics com singènics després del trasplantament, i amb l'estudi de Gysemans *et al.* (Gysemans et al., 2003) en que determinen un increment d'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B i altres citocines en empelts d'illots xenogènics a les 8 hores del trasplantament, donen suport a la hipòtesi que la inflamació no específica que té lloc els primers dies després del trasplantament d'illots pancreàtics, pot afectar negativament la funció i la viabilitat de les cèl·lules beta trasplantades i que la IL-1 pot tenir-hi un paper molt important.

En definitiva, la manca d'efecte d'IGF2 que hem observat sobre la supervivència de les cèl·lules beta trasplantades, està en concordança amb dades anteriors que mostren resultats negatius similars utilitzant altres aproximacions terapèutiques, que van aconseguir millorar el resultat del trasplantament d'illots a llarg termini però no van tenir la capacitat d'augmentar la supervivència inicial dels illots (Emamaullee and Shapiro, 2006). El nostre grup també s'ha trobat amb aquesta dificultat en experiments previs, en els quals es va observar que els efectes beneficiosos de la normoglicèmia (Merino et al., 1997) i de la sobreexpressió de l'antagonista del receptor de la IL-1 (Téllez et al., 2007) en el resultat del trasplantament d'illots no estaven associats amb una reducció de l'apoptosi inicial de les cèl·lules beta. Si bé és cert que en un altre estudi del nostre grup, es va aconseguir reduir l'apoptosi inicial post-trasplantament en

preincubar els illots amb 200 o 500  $\mu\text{M}$  de l'inhibidor de les caspases (z-VAD.fmk) (Montolio et al., 2005). Robitaille *et al.* van descriure que el trasplantament d'illots encapsulats prèviament incubats amb IGF2 els va permetre augmentar el percentatge de ratolins diabètics que assolien la normogluccèmia, tot i que convé destacar que l'apoptosi no va ser determinada en els empelts (Robitaille et al., 2003).

La pèrdua de massa beta trasplantada inicial es dona fins i tot en el model que hem utilitzat, en el que les condicions del trasplantament són òptimes: en primer lloc, s'utilitza un model singènic, que com ja s'ha comentat, permet descartar la contribució del rebuig i evita l'ús de tractaments immunosupressors, que poden ser tòxics pel teixit trasplantat i conduir a la pèrdua de teixit insular després del trasplantament (Shapiro et al., 2000); en segon lloc, no es trasplanten illots superiors a 200  $\mu\text{m}$  de diàmetre per evitar al màxim la hipòxia que pateixen els illots més grans; per últim, els illots són trasplantats sota la càpsula renal, lloc que ofereix bones condicions pel creixement de les cèl·lules insulars trasplantades (Mellgren et al., 1986).

Per tant, la gran pèrdua de massa beta, malgrat les òptimes condicions del trasplantament, juntament amb la manca d'eficàcia de diverses estratègies terapèutiques, posa de relleu la dificultat de reduir la mort cel·lular beta que es dona els primers dies després del trasplantament d'illots, moment en que són particularment vulnerables (Biarnés et al., 2002; Davalli et al., 1996). Potser un enfoc de tipus multifactorial aconseguiria un millor resultat.

Adicionalment, en el nostre treball també hem determinat que els nivells d'apoptosi a més llarg termini, 10 i 28 dies després del trasplantament, continuen augmentats. En aquest cas els factors implicats en l'augment de l'apoptosi són diferents als causants de la mort a dia 3 després del trasplantament. Factors com l'anoikis i la hipòxia és d'esperar que no tinguin ja la importància que tenen els primers dies post-trasplantament. Ara bé, a més llarg termini els empelts han estat sotmesos a hipergluccèmia crònica, un factor inductor d'estrès de gran importància. L'increment de l'apoptosi de les cèl·lules beta induït per la hipergluccèmia sostinguda ha estat ben establert (Biarnés et al., 2002; Donath et al., 1999; Korsgren et al., 1990). La formació de productes glucosilats, l'increment de la producció d'espècies reactives d'oxigen i les modificacions proteiques mitjançant O-Glc-Nac s'han suggerit com a possibles mediadors del dany cel·lular beta induït per la hipergluccèmia a llarg termini. També és possible que la manca d'un factor de supervivència com és la insulina contribueixi a l'augment de la mort cel·lular beta després de 28 dies del trasplantament. S'ha descrit que els illots trasplantats

exposats a hiperglucèmia crònica pateixen una reducció greu del contingut d'insulina (Merino et al., 1997) i una disminució de la transcripció del gen de la insulina (Raurell et al., 1999). També s'ha definit que la insulina per ella mateixa podria promoure la supervivència de forma autocrina de les cèl·lules de l'illot, a la vegada que ajudaria a modular els efectes d'una gran varietat d'estímuls nocius (Paraskevas et al., 2001). El fet que els empelts d'illots exposats a hiperglucèmia crònica presentin un contingut baix d'insulina, conjuntament amb els baixos nivells ambientals de l'hormona, podria ser una de les causes d'aquest augment de la mort per apoptosi en els empelts dels animals hiperglicèmics 28 dies després del trasplantament.

Després de l'estudi de la mort cel·lular beta es va estudiar la replicació de les cèl·lules beta trasplantades i l'efecte de l'IGF2 sobre aquesta. En aquest sentit vam determinar que la sobreexpressió d'IGF2 resulta en la hiperplàsia sostinguda de les cèl·lules beta dels illots trasplantats, els quals han presentat al llarg de l'estudi una proliferació augmentada respecte els illots trasplantats no infectats i els illots pancreàtics endògens de rates sanes.

La capacitat replicativa de les cèl·lules beta es redueix paulatinament durant la primera etapa de la vida, tant en humans com en rosegadors, i en l'adult la taxa proliferativa és particularment baixa. En el cas de la rata els nivells de replicació de les cèl·lules beta pancreàtiques disminueixen del 1% en animals joves (1 mes d'edat) fins a valors sobre del 0.12% en rates adultes, ara bé aquesta taxa replicativa es manté de manera estable a partir dels 7 mesos (Montanya et al., 2000) tot i que pot estar sotmesa a variacions en funció de la demanda metabòlica de l'individu per tal de garantir un bon control glucèmic en situacions extraordinàries (Bonner-Weir et al., 1989; Montaña et al., 1994). S'ha postulat que en l'illot existeixen diferents tipus de cèl·lula beta: d'una banda el pool replicatiu, que inclouria les cèl·lules beta capaces de dividir-se per mitosi en resposta a diferents factors de creixement, i de l'altra el pool senescent, compost per aquelles cèl·lules beta funcionals incapaces de replicar (Fellous et al., 2007; Gershengorn et al., 2004). Tanmateix altres estudis demostren que, en ratolins adults, totes les cèl·lules beta comparteixen aquesta capacitat replicativa, i per tant, participen de forma equitativa en el manteniment de la massa cel·lular beta (Brennand et al., 2007) i tenen la capacitat de replicar quan es sotmeten a estímuls proliferatius.

Està acceptat que la glucosa és un estimulador molt potent de la proliferació beta (Bonner-Weir et al., 1989). Així doncs, seria d'esperar que en una situació d'hiperglucèmia aguda on la demanda metabòlica esta augmentada, com és la situació en que estan sotmesos els illots els

primers dies després del trasplantament en el nostre estudi, s'estimulés la replicació cel·lular de l'empelt. Però en contrast vam observar que el dia 3 després del trasplantament, quan els illots estaven exposats a hiperglucèmia, la replicació de les cèl·lules beta dels illots trasplantats no era significativament superior en els empelts d'illots control no infectats respecte la replicació en els illots endògens del pàncrees de rates sanes. Aquest resultat és concordant amb dades anteriors del nostre grup que mostren que la replicació de les cèl·lules beta es troba alterada els primers dies després del trasplantament (Biarnés et al., 2002).

Malgrat el gran nombre de factors que poden estar inhibint l'estímul mitogènic de la glucosa, treballs previs del nostre grup han determinat que la limitació de la replicació de les cèl·lules beta els primers dies després del trasplantament es deu, almenys parcialment, a la acció inespecífica produïda per la IL-1 $\beta$  (Montolio et al., 2007a; Téllez et al., 2005). Conseqüentment i en concordança amb els resultats prèviament obtinguts *in vitro*, l'augment de la replicació observada 3 dies després del trasplantament en els empelts d'illots que sobreexpressen IGF2 suggereix que l'IGF2 és capaç d'evitar, en part, els efectes supressors de la IL-1 $\beta$  sobre la replicació de les cèl·lules beta també *in vivo*.

L'anàlisi de l'evolució de la taxa de replicació de les cèl·lules beta dels illots trasplantats a diferents temps ens va permetre determinar que a dia 10 post-trasplantament es dona un augment significatiu de la replicació en els empelts del grup control respecte el pàncrees normal. Aquest resultat podria ser degut al fet que l'increment de l'expressió de citocines proinflamatòries observat el primer dia després del trasplantament disminueix de manera progressiva els dies 3 i 7 (Montolio et al., 2007a; Montolio et al., 2007b). Per tant, la disminució dels nivells d'expressió de citocines proinflamatòries en els empelts, i del seu efecte supressor sobre la replicació beta, conjuntament amb l'exposició a l'alta glucosa podrien explicar l'augment de la replicació observat a dia 10 en els empelts control i la potenciació de l'efecte proliferatiu en els empelts del grup Ad-IGF2.

L'augment de la replicació beta induïda per glucosa no es manté quan els illots s'exposen a nivells elevats de glucosa de forma crònica (Biarnés et al., 2002; Kaufman et al., 1988; Nacher et al., 1998). En concordança, en els empelts d'illots control exposats durant 28 dies a hiperglucèmia sostinguda els nivells de proliferació de les cèl·lules beta van caure respecte els nivells observats a dia 10. Resultats similars s'han obtingut *in vitro* on s'ha determinat una limitació de la proliferació de les cèl·lules beta dels illots exposats a concentracions elevades de

glucosa de forma mantinguda. Aquest efecte de l'exposició a nivells de glucosa sostinguts s'ha associat, d'una banda amb la regulació negativa de FLIP (de l'anglès FLICE-Inhibitory protein), les proteïnes FLIPs són proteïnes inhibidores de l'activació de la caspasa 8 que tenen la capacitat d'inhibir l'apoptosi induïda per diversos receptors de mort (Maedler et al., 2002a), i de l'altra amb l'augment de l'expressió de p21 i p53 (Kim et al., 2005). p21 codifica per la proteïna inhibidora de la quinasa dependent de ciclina 1A (CDKN1A) que actua com a reguladora de la progressió del cicle cel·lular, l'expressió de p21 es troba fortament regulada pel gen supressor de tumors p53, i és la manera com la cèl·lula atura el cicle en resposta a un estímul d'estrés. CDKN1A pot interactuar amb l'antigen nuclear de les cèl·lules proliferants (PCNA), jugant per tant, un paper crític en la replicació i la reparació del DNA en la fase S del cicle cel·lular. CDKN1A també s'ha relacionat amb l'activació de caspases i l'activació de l'apoptosi. Aquestes evidències indiquen una estreta relació entre l'apoptosi i la limitació de la proliferació induïdes per l'exposició a alta glucosa de forma sostinguda.

La sobreexpressió d'IGF2 va provocar un augment de la replicació de les cèl·lules beta a dia 28 després del trasplantament, indicant que l'IGF2 és capaç de superar la limitació de la replicació deguda a l'exposició mantinguda a alta glucosa. El mecanisme pel qual IGF2 augmenta la replicació beta en els illots exposats a hiperglucèmia crònica és encara desconegut, però tal i com ha estat descrit per IGF1 (Withers et al., 1999), la sobreexpressió d'IGF2 en cèl·lules dels illots podria augmentar l'expressió de substrat del receptor d'insulina 2 (IRS-2), una proteïna que juga un paper crucial en el creixement de les cèl·lules beta.

Un altre paràmetre amb influència sobre el balanç de la massa beta és la mida individual de les cèl·lules beta. S'ha determinat que l'exposició a alta glucosa provoca la hipertròfia de les cèl·lules beta (Topp et al., 2004), ara bé, els mecanismes intracel·lulars que porten a l'increment de la mida cel·lular beta no són encara ben coneguts. En el nostre treball hem observat un increment significatiu de la mida individual de les cèl·lules beta en els empelts de dia 10 i 28 després del trasplantament però la sobreexpressió d'IGF2 no va augmentar la mida d'individual de les cèl·lules beta respecte el grup control. Aquests resultats estan en concordança amb les dades descrites en ratolins transgènics on es va determinar que la sobreexpressió d'IGF2 no induïx hipertròfia de les cèl·lules alfa ni beta (Devedjian et al., 2000).

Els diversos paràmetres estudiats, hipertròfia, apoptosi i replicació de les cèl·lules beta dels illots, determinen l'evolució de la massa beta després del trasplantament. L'anàlisi de la massa

beta ens permet obtenir una visió general de la importància i la participació de la mort cel·lular, la proliferació i la mida individual de les cèl·lules beta sobre el pronòstic de l'empelt.

Els nostres resultats indiquen que, en un context on l'apoptosi es manté de forma estable, l'evolució de la massa beta trasplantada és paral·lela als nivells de replicació de les cèl·lules beta dels empelts d'illots trasplantats. En el grup control l'augment de replicació observat en els empelts de dia 10 es tradueix en un augment en la massa beta. En canvi, en els empelts exposats a hiperglucèmia crònica (28 dies), en caure la taxa de proliferació, la massa beta decreix novament. En contrast, en els empelts d'illots de 28 dies que sobreexpressen IGF2 la massa beta es manté d'acord amb l'alta taxa replicativa de les cèl·lules beta d'aquest grup.

Per comprovar si l'increment de la massa beta observat en el grup Ad-IGF2 es tradueix en una reducció del nombre d'illots necessaris per restablir la normoglucèmia dels animals diabètics varem trasplantar 800 illots a rates diabètiques per STZ. Vuit-cents illots és una massa subcrítica per aconseguir el restabliment de la normoglucèmia en animals diabètics trasplantats. La massa subcrítica es defineix com aquella massa lleugerament inferior a la massa necessària per restablir la normoglucèmia en animals diabètics i amb la que s'espera que un percentatge dels animals es mantindran hiperglicèmics.

Vam comprovar que els animals trasplantats amb illots Ad-IGF2 assolien més, i més ràpidament, la normoglucèmia. El 100% dels animals trasplantats amb illots que sobreexpressaven IGF2 van assolir la normoglucèmia 10 dies després del trasplantament i la varen mantenir fins a l'extracció de l'empelt, a dia 60. En canvi, només el 14% dels animals trasplantats amb illots control (illots no transfectats i illots Ad-Luc) assolien la normoglucèmia a dia 10 post-trasplantament, i tan sols el 71% dels animals aconseguien la normoglucèmia al llarg del temps de seguiment (dia 21-28 després del trasplantament), mantenint nivells de glucèmia estadísticament superiors al llarg de tot l'estudi.

Un altre dels efectes de la sobreexpressió d'IGF2 es va reflexar en el test de tolerància a la glucosa. Els animals trasplantats amb illots Ad-IGF2 presentaven una intolerància a la glucosa atenuada respecte els animals trasplantats amb illots control no infectats i illots infectats amb l'adenovirus control, amb nivells de glucosa inferiors 30, 60 o 90 minuts després de l'administració de glucosa i assolint valors similars als dels animals control no diabètics als 120 minuts. L'àrea sota la corba també era inferior en el grup Ad-IGF2 respecte els grups control.

En resum, ja que la sobreexpressió d'IGF2 no va modificar la secreció d'insulina, no va reduir la mort cel·lular beta i no va induir la hipertrofia cel·lular beta, proposem que l'augment de la massa de cèl·lules beta en els empelts d'illots que sobreexpressaven IGF2 i la millora de l'evolució metabòlica va ser la conseqüència de l'increment sostingut de la replicació de les cèl·lules beta al llarg del primer mes posterior al trasplantament, que va donar lloc a un augment de la massa beta, amb una major capacitat per secretar insulina.

En el trasplantament clínic d'illots a pacients cal aportar una gran quantitat d'illots per aconseguir la normogluccèmia i normalment és necessari realitzar entre dos o tres trasplantaments (Korsgren et al., 2008; Ryan et al., 2005; Shapiro et al., 2000). El procés de trasplantament comporta una important pèrdua de la massa insular trasplantada i la massa beta que finalment s'implanta és mínimament suficient per mantenir la normogluccèmia. Com a conseqüència qualsevol reducció posterior pot provocar la reparició de la hipergluccèmia (Korsgren et al., 2008). Així doncs, la preservació de la massa beta inicialment trasplantada pot portar a una millora en el resultat a llarg termini, i en aquest estudi hem demostrat que una estratègia de teràpia gènica orientada a augmentar la replicació de les cèl·lules beta trasplantades ha estat capaç de regenerar la massa beta trasplantada i millorar el resultat del trasplantament d'illots.

En conclusió, els nostres resultats *in vitro* indiquen que la replicació de les cèl·lules beta és molt sensible als efectes deleteris de la IL-1 $\beta$ . Aquest fort efecte supressor de la IL-1 $\beta$  sobre la replicació de les cèl·lules beta pot ser rellevant en el procés que condueix a la pèrdua de la massa de cèl·lules beta en la diabetis i els primers dies després del trasplantament d'illots. *In vitro*, la sobreexpressió d'IGF2 protegeix els illots enfront de la inhibició de la replicació, la inducció de l'apoptosi i impedeix la producció de NO induïda per la citocina. *In vivo* la sobreexpressió d'IGF2, sense reduir l'apoptosi o modificar la mida individual de les cèl·lules beta, promou l'augment de la massa beta en l'empelt d'illots mitjançant l'increment sostingut de la replicació beta dels illots trasplantats i millora el pronòstic del trasplantament. Els beneficis d'IGF2 sobre el trasplantament d'illots suggereixen que estratègies dirigides a augmentar la proliferació beta poden ser útils per induir la regeneració de la massa beta pel tractament de la diabetis i en el trasplantament d'illots.

**CONCLUSIONS**



1. La citocina proinflamatòria IL-1 $\beta$  exerceix un doble efecte sobre les cèl·lules beta pancreàtiques dels illots, d'una banda inhibeix dràsticament la seva proliferació i de l'altra n'indueix l'apoptosi.
2. La replicació de les cèl·lules beta és més sensible que l'apoptosi als efectes deleteris de la IL-1 $\beta$ .
3. La sobreexpressió d'IGF2 estimula la proliferació de les cèl·lules beta, protegeix dels efectes deleteris de la IL-1 $\beta$  sobre la viabilitat i impedeix, en part, el profund efecte inhibitori de la citocina sobre la replicació de les cèl·lules beta.
4. La sobreexpressió d'IGF2 en els illots trasplantats estimula la proliferació de les cèl·lules beta de manera sostinguda després del trasplantament, però no en redueix l'apoptosi.
5. L'increment de la replicació en els empelts d'illots que sobreexpressen IGF2 es tradueix en la regeneració de la massa beta trasplantada.
6. La regeneració de la massa beta en els empelts d'illots que sobreexpressen IGF2 es reflexa en la millora del pronòstic del trasplantament.
7. Aquest treball suggereix que estratègies dirigides a augmentar la proliferació beta poden ser útils per induir la regeneració de la massa beta pel tractament de la diabetis i en el trasplantament d'illots.



## **BIBLIOGRAFIA**



**A**

Accili, D., Drago, J., Lee, E.J., Johnson, M.D., Cool, M.H., Salvatore, P., Asico, L.D., José, P.A., Taylor, S.I., and Westphal, H. (1996). Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet* 12, 106-109.

Achenbach, P., Bonifacio, E., Koczwara, K., and Ziegler, A.G. (2005). Natural history of type 1 diabetes. *Diabetes* 54 Suppl 2, S25-31.

Adams, T.E., McKern, N.M., and Ward, C.W. (2004). Signalling by the type 1 insulin-like growth factor receptor: interplay with the epidermal growth factor receptor. *Growth Factors* 22, 89-95.

Ahnfelt-Rønne, J., Ravassard, P., Pardanaud-Glavieux, C., Scharfmann, R., and Serup, P. (2010). Mesenchymal bone morphogenetic protein signaling is required for normal pancreas development. *Diabetes* 59, 1948-1956.

Amalfitano, A., Hauser, M.A., Hu, H., Serra, D., Begy, C.R., and Chamberlain, J.S. (1998). Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *J Virol* 72, 926-933.

Ammendrup, A., Maillard, A., Nielsen, K., Aabenhus Andersen, N., Serup, P., Dragsbaek Madsen, O., Mandrup-Poulsen, T., and Bonny, C. (2000). The c-Jun amino-terminal kinase pathway is preferentially activated by interleukin-1 and controls apoptosis in differentiating pancreatic beta-cells. *Diabetes* 49, 1468-1476.

Anderson, C.W., Young, M.E., and Flint, S.J. (1989). Characterization of the adenovirus 2 virion protein, mu. *Virology* 172, 506-512.

Andersson, A., Korsgren, O., and Jansson, L. (1989). Intraportally transplanted pancreatic islets revascularized from hepatic arterial system. *Diabetes* 38 Suppl 1, 192-195.

Andréoletti, L., Hober, D., Hober-Vandenberghe, C., Belaich, S., Vantghem, M.C., Lefebvre, J., and Wattré, P. (1997). Detection of coxsackie B virus RNA sequences in whole blood samples from adult patients at the onset of type I diabetes mellitus. *J Med Virol* 52, 121-127.

Ansari, M.J., Salama, A.D., Chitnis, T., Smith, R.N., Yagita, H., Akiba, H., Yamazaki, T., Azuma, M., Iwai, H., Khoury, S.J., et al. (2003). The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 198, 63-69.

Arnberg, N., Kidd, A.H., Edlund, K., Nilsson, J., Pring-Akerblom, P., and Wadell, G. (2002). Adenovirus type 37 binds to cell surface sialic acid through a charge-dependent interaction. *Virology* 302, 33-43.

Arnberg, N., Kidd, A.H., Edlund, K., Olfat, F., and Wadell, G. (2000). Initial interactions of subgenus D adenoviruses with A549 cellular receptors: sialic acid versus alpha(v) integrins. *J Virol* 74, 7691-7693.

Arnush, M., Heitmeier, M.R., Scarim, A.L., Marino, M.H., Manning, P.T., and Corbett, J.A. (1998a). IL-1 produced and released endogenously within human islets inhibits beta cell function. *J Clin Invest* 102, 516-526.

Arnush, M., Scarim, A.L., Heitmeier, M.R., Kelly, C.B., and Corbett, J.A. (1998b). Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes. *J Immunol* 160, 2684-2691.

Asfari, M., De, W., Nöel, M., Holthuisen, P., and Czernichow, P. (1995). Insulin-like growth factor-II gene expression in a rat insulin-producing beta-cell line (INS-1) is regulated by glucose. *Diabetologia* 38, 927-935.

Atkinson, M.A. (2005). ADA Outstanding Scientific Achievement Lecture 2004. Thirty years of investigating the autoimmune basis for type 1 diabetes: why can't we prevent or reverse this disease? *Diabetes* 54, 1253-1263.

Atkinson, M.A., and Eisenbarth, G.S. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358, 221-229.

Attali, M., Stetsyuk, V., Basmaciogullari, A., Aiello, V., Zanta-Boussif, M.A., Duvillie, B., and Scharfmann, R. (2007). Control of beta-cell differentiation by the pancreatic mesenchyme. *Diabetes* 56, 1248-1258.

## **B**

Baeyens, L., Bonn e, S., Bos, T., Rooman, I., Peleman, C., Lahoutte, T., German, M., Heimberg, H., and Bouwens, L. (2009). Notch signaling as gatekeeper of rat acinar-to-beta-cell conversion in vitro. *Gastroenterology* 136, 1750-1760.e1713.

Baeyens, L., and Bouwens, L. (2008). Can beta-cells be derived from exocrine pancreas? *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4, 170-178.

Ball, E.M., and Risbridger, G.P. (2001). Activins as regulators of branching morphogenesis. *Dev Biol* 238, 1-12.

Ballinger, W.F., and Lacy, P.E. (1972). Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 72, 175-186.

Banerjee, M., and Saxena, M. (2012). Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: Role in Type 2 Diabetes. *Clin Chim Acta* 413, 1163-1170.

Bangari, D.S., and Mittal, S.K. (2005). Porcine adenovirus serotype 3 internalization is independent of CAR and alphavbeta3 or alphavbeta5 integrin. *Virology* 332, 157-166.

Barbu, A., Akusj arvi, G., and Welsh, N. (2005a). Adenoviral-mediated transduction of human pancreatic islets: importance of adenoviral genome for cell viability and association with a deficient antiviral response. *Endocrinology* 146, 2406-2414.

Baxter, R.C., Holman, S.R., Corbould, A., Stranks, S., Ho, P.J., and Braund, W. (1995). Regulation of the insulin-like growth factors and their binding proteins by glucocorticoid and growth hormone in nonislet cell tumor hypoglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 2700-2708.

Beattie, G.M., Itkin-Ansari, P., Cirulli, V., Leibowitz, G., Lopez, A.D., Bossie, S., Mally, M.I., Levine, F., and Hayek, A. (1999). Sustained proliferation of PDX-1+ cells derived from human islets. *Diabetes* 48, 1013-1019.

Beattie, G.M., Leibowitz, G., Lopez, A.D., Levine, F., and Hayek, A. (2000). Protection from cell death in cultured human fetal pancreatic cells. *Cell Transplant* 9, 431-438.

Beattie, G.M., Montgomery, A.M., Lopez, A.D., Hao, E., Perez, B., Just, M.L., Lakey, J.R., Hart, M.E., and Hayek, A. (2002). A novel approach to increase human islet cell mass while preserving beta-cell function. *Diabetes* 51, 3435-3439.

Becker, T.C., BeltrandelRio, H., Noel, R.J., Johnson, J.H., and Newgard, C.B. (1994a). 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.

Becker, T.C., Noel, R.J., Coats, W.S., Gómez-Foix, A.M., Alam, T., Gerard, R.D., and Newgard, C.B. (1994b). Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells. *Methods Cell Biol* 43 Pt A, 161-189.

Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., and Vigneri, R. (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev* 30, 586-623.

Benhamou, P.Y., Moriscot, C., Prevost, P., Rolland, E., Halimi, S., and Chroboczek, J. (1997). Standardization of procedure for efficient ex vivo gene transfer into porcine pancreatic islets with cationic liposomes. *Transplantation* 63, 1798-1803.

Bennett, E.M., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., and Brodsky, F.M. (1999). Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression. *J Immunol* 162, 5049-5052.

Ber, I., Shternhall, K., Perl, S., Ohanuna, Z., Goldberg, I., Barshack, I., Benvenisti-Zarum, L., Meivar-Levy, I., and Ferber, S. (2003). Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation. *J Biol Chem* 278, 31950-31957.

Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L., and Finberg, R.W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275, 1320-1323.

Bergsten, P. (1995). Slow and fast oscillations of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in pancreatic islets correspond to pulsatile insulin release. *Am J Physiol* 268, E282-287.

Berkner, K.L. (1988). Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes. *Biotechniques* 6, 616-629.

Bernal-Mizrachi, E., Wen, W., Stahlhut, S., Welling, C.M., and Permutt, M.A. (2001). Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. *J Clin Invest* 108, 1631-1638.

Berney, T., Bühler, L.H., and Morel, P. (2005). Pancreas allocation in the era of islet transplantation. *Transpl Int* 18, 763-767.

Biarnés, M., Montolio, M., Nacher, V., Raurell, M., Soler, J., and Montanya, E. (2002). Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes* 51, 66-72.

Billestrup, N., and Nielsen, J.H. (1991). 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.

Billestrup, N., and Otonkoski, T. (2008). Dedifferentiation for replication of human beta-cells: a division between mice and men? *Diabetes* 57, 1457-1458.

Binoux, M., Lalou, C., Lassarre, C., Blat, C., and Hossenlopp, P. (1993). Limited proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3): a physiological mechanism in the regulation of IGF bioavailability. *Adv Exp Med Biol* 343, 293-300.

Bonner-Weir, S., Baxter, L.A., Schuppin, G.T., and Smith, F.E. (1993). A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 42, 1715-1720.

Bonner-Weir, S., Deery, D., Leahy, J., and Weir, G. (1989). Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes* 38, 49-53.

Bonner-Weir, S., Taneja, M., Weir, G.C., Tatarkiewicz, K., Song, K.H., Sharma, A., and O'Neil, J.J. (2000). In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7999-8004.

Bonner-Weir, S., and Weir, G.C. (2005). New sources of pancreatic beta-cells. *Nat Biotechnol* 23, 857-861.

Bonny, C., Oberson, A., Negri, S., Sauser, C., and Schorderet, D.F. (2001). Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death. *Diabetes* 50, 77-82.

Borowiak, M., and Melton, D.A. (2009). How to make beta cells? *Curr Opin Cell Biol* 21, 727-732.

Bregenholt, S., Wang, M., Wolfe, T., Hughes, A., Baerentzen, L., Dyrberg, T., von Herrath, M.G., and Petersen, J.S. (2003). The cholera toxin B subunit is a mucosal adjuvant for oral tolerance induction in type 1 diabetes. *Scand J Immunol* 57, 432-438.

Brennand, K., Huangfu, D., and Melton, D. (2007). All beta cells contribute equally to islet growth and maintenance. *PLoS Biol* 5, e163.

Brooks, J.W., and Mizel, S.B. (1994). Interleukin-1 signal transduction. *Eur Cytokine Netw* 5, 547-561.

Broughton, S., and Partridge, L. (2009). Insulin/IGF-like signalling, the central nervous system and aging. *Biochem J* 418, 1-12.

Brun, T., Franklin, I., St-Onge, L., Biason-Lauber, A., Schoenle, E.J., Wollheim, C.B., and Gauthier, B.R. (2004). The diabetes-linked transcription factor PAX4 promotes  $\beta$ -cell proliferation and survival in rat and human islets. *J Cell Biol* 167, 1123-1135.

Butler, A., Galasso, R., Meier, J., Basu, R., Rizza, R., and Butler, P. (2007). Modestly increased beta cell apoptosis but no increased beta cell replication in recent-onset type 1 diabetic patients who died of diabetic ketoacidosis. *Diabetologia* 50, 2323-2331.

Butler, A., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R., and Butler, P. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52, 102-110.

Butler, A.E., Galasso, R., Matveyenko, A., Rizza, R.A., Dry, S., and Butler, P.C. (2010). Pancreatic duct replication is increased with obesity and type 2 diabetes in humans. *Diabetologia* 53, 21-26.

## C

Calderari, S., Gangnerau, M.N., Thibault, M., Meile, M.J., Kassis, N., Alvarez, C., Portha, B., and Serradas, P. (2007). Defective IGF2 and IGF1R protein production in embryonic pancreas precedes beta cell mass anomaly in the Goto-Kakizaki rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 50, 1463-1471.

Callejas, D., Mann, C.J., Ayuso, E., Lage, R., Grifoll, I., Roca, C., Andaluz, A., Ruiz-de Gopegui, R., Montané, J., Muñoz, S., et al. (2013). Treatment of diabetes and long-term survival after insulin and glucokinase gene therapy. *Diabetes* 62, 1718-1729.

Cameron, M.J., Arreaza, G.A., Grattan, M., Meagher, C., Sharif, S., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Cook, D.N., and Delovitch, T.L. (2000). Differential expression of CC chemokines and the CCR5 receptor in the pancreas is associated with progression to type I diabetes. *J Immunol* 165, 1102-1110.

Caravokyri, C., and Leppard, K.N. (1996). Human adenovirus type 5 variants with sequence alterations flanking the E2A gene: effects on E2 expression and DNA replication. *Virus Genes* 12, 65-75.

Castrillo, A., Bodelón, O., and Boscá, L. (2000). Inhibitory effect of IGF-I on type 2 nitric oxide synthase expression in Ins-1 cells and protection against activation-dependent apoptosis: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetes* 49, 209-217.

Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.

Cheshenko, N., Krougliak, N., Eisensmith, R.C., and Krougliak, V.A. (2001). A novel system for the production of fully deleted adenovirus vectors that does not require helper adenovirus. *Gene Ther* 8, 846-854.

Christofori, G., Naik, P., and Hanahan, D. (1995). Deregulation of both imprinted and expressed alleles of the insulin-like growth factor 2 gene during beta-cell tumorigenesis. *Nat Genet* 10, 196-201.

Cnop, M., Hughes, S.J., Igoillo-Esteve, M., Hoppa, M.B., Sayyed, F., van de Laar, L., Gunter, J.H., de Koning, E.J., Walls, G.V., Gray, D.W., et al. (2010). The long lifespan and low turnover of human islet beta cells estimated by mathematical modelling of lipofuscin accumulation. *Diabetologia* 53, 321-330.

Cohen, P. (2006). The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 867-873.

Contreras, J.L., Bilbao, G., Smyth, C., Eckhoff, D.E., Xiang, X.L., Jenkins, S., Cartner, S., Curiel, D.T., Thomas, F.T., and Thomas, J.M. (2001). 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.

Coppieters, K.T., Dotta, F., Amirian, N., Campbell, P.D., Kay, T.W., Atkinson, M.A., Roep, B.O., and von Herrath, M.G. (2012). Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulinitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. *J Exp Med* 209, 51-60.

Corbett, J.A., and McDaniel, M.L. (1995). 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.

Cornu, M., Yang, J.Y., Jaccard, E., Poussin, C., Widmann, C., and Thorens, B. (2009). Glucagon-like peptide-1 protects beta-cells against apoptosis by increasing the activity of an IGF-2/IGF-1 receptor autocrine loop. *Diabetes* 58, 1816-1825.

Cozar-Castellano, I., Takane, K.K., Bottino, R., Balamurugan, A.N., and Stewart, A.F. (2004). Induction of beta-cell proliferation and retinoblastoma protein phosphorylation in rat and human islets using adenovirus-mediated transfer of cyclin-dependent kinase-4 and cyclin D1. *Diabetes* 53, 149-159.

Creusot, R.J., Yaghoubi, S.S., Kodama, K., Dang, D.N., Dang, V.H., Breckpot, K., Thielemans, K., Gambhir, S.S., and Fathman, C.G. (2008). Tissue-targeted therapy of autoimmune diabetes using dendritic cells transduced to express IL-4 in NOD mice. *Clin Immunol* 127, 176-187.

Cui, H. (2007). Loss of imprinting of IGF2 as an epigenetic marker for the risk of human cancer. *Dis Markers* 23, 105-112.

## D

Danthinne, X., and Imperiale, M.J. (2000). Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther* 7, 1707-1714.

Darville, M., and Eizirik, D. (1998). Regulation by cytokines of the inducible nitric oxide synthase promoter in insulin-producing cells. *Diabetologia* 41, 1101-1108.

Daughaday, W.H., Emanuele, M.A., Brooks, M.H., Barbato, A.L., Kapadia, M., and Rotwein, P. (1988). Synthesis and secretion of insulin-like growth factor II by a leiomyosarcoma with associated hypoglycemia. *N Engl J Med* 319, 1434-1440.

Daughaday, W.H., Hall, K., Raben, M.S., Salmon, W.D., van den Brande, J.L., and van Wyk, J.J. (1972). Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 235, 107.

Daughaday, W.H., Phillips, L.S., and Herington, A.C. (1975). Measurement of somatomedin by cartilage in vitro. *Methods Enzymol* 37 Pt B, 93-109.

Daughaday, W.H., and Reeder, C. (1966). Synchronous activation of DNA synthesis in hypophysectomized rat cartilage by growth hormone. *J Lab Clin Med* 68, 357-368.

Daughaday, W.H., and Trivedi, B. (1992). Measurement of derivatives of proinsulin-like growth factor-II in serum by a radioimmunoassay directed against the E-domain in normal subjects and patients with nonislet cell tumor hypoglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 75, 110-115.

Davalli, A., Scaglia, L., Zangen, D., Hollister, J., Bonner-Weir, S., and Weir, G. (1996). Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period. Dynamic changes in structure and function. *Diabetes* 45, 1161-1167.

Davison, A.J., Benko, M., and Harrach, B. (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* 84, 2895-2908.

De León, D.D., and Stanley, C.A. (2007). Mechanisms of Disease: advances in diagnosis and treatment of hyperinsulinism in neonates. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3, 57-68.

De Meyts, P., Christoffersen, C.T., Ursø, B., Wallach, B., Grønskov, K., Yakushiji, F., and Shymko, R.M. (1995). Role of the time factor in signaling specificity: application to mitogenic and metabolic signaling by the insulin and insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinases. *Metabolism* 44, 2-11.

Dean, P.M. (1973). Ultrastructural morphometry of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Diabetologia* 9, 115-119.

DeChiara, T.M., Efstratiadis, A., and Robertson, E.J. (1990). A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 345, 78-80.

Delaney, C.A., Pavlovic, D., Hoorens, A., Pipeleers, D.G., and Eizirik, D.L. (1997). Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. *Endocrinology* 138, 2610-2614.

Denley, A., Brierley, G.V., Carroll, J.M., Lindenberg, A., Booker, G.W., Cosgrove, L.J., Wallace, J.C., Forbes, B.E., and Roberts, C.T. (2006). Differential activation of insulin receptor isoforms by insulin-like growth factors is determined by the C domain. *Endocrinology* 147, 1029-1036.

Devedjian, J., George, M., Casellas, A., Pujol, A., Visa, J., Pelegrín, M., Gros, L., and Bosch, F. (2000). Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor-II in beta cells develop type 2 diabetes. *J Clin Invest* 105, 731-740.

Devendra, D., Liu, E., and Eisenbarth, G. (2004). Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ* 328, 750-754.

Diamond, A.S., and Gill, R.G. (2000). An essential contribution by IFN-gamma to CD8+ T cell-mediated rejection of pancreatic islet allografts. *J Immunol* 165, 247-255.

Dickson, L.M., and Rhodes, C.J. (2004). 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, E192-198.

Dinarello, C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095-2147.

Dionne, K.E., Colton, C.K., and Yarmush, M.L. (1993). Effect of hypoxia on insulin secretion by isolated rat and canine islets of Langerhans. *Diabetes* 42, 12-21.

Diraison, F., Parton, L., Ferré, P., Foufelle, F., Briscoe, C.P., Leclerc, I., and Rutter, G.A. (2004). Over-expression of sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP1c) in rat pancreatic islets induces lipogenesis and decreases glucose-stimulated insulin release: modulation by 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR). *Biochem J* 378, 769-778.

Donath, M., Gross, D., Cerasi, E., and Kaiser, N. (1999). Hyperglycemia-induced beta-cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* 48, 738-744.

Dor, Y., Brown, J., Martinez, O., and Melton, D. (2004). Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429, 41-46.

Doyle, M.E., and Egan, J.M. (2007). Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol Ther* 113, 546-593.

Dupont, J., Khan, J., Qu, B.H., Metzler, P., Helman, L., and LeRoith, D. (2001). Insulin and IGF-1 induce different patterns of gene expression in mouse fibroblast NIH-3T3 cells: identification by cDNA microarray analysis. *Endocrinology* 142, 4969-4975.

Dupont, J., Pierre, A., Froment, P., and Moreau, C. (2003). The insulin-like growth factor axis in cell cycle progression. *Horm Metab Res* 35, 740-750.

Duvillié, B., Attali, M., Bounacer, A., Ravassard, P., Basmaciogullari, A., and Scharfmann, R. (2006). The mesenchyme controls the timing of pancreatic beta-cell differentiation. *Diabetes* 55, 582-589.

Duvillié, B., Stetsyuk, V., Filhoulaud, G., Guillemain, G., and Scharfmann, R. (2008). Control of pancreatic development by intercellular signals. *Biochem Soc Trans* 36, 276-279.

Dénes, B., Yu, J., Fodor, N., Takátsy, Z., Fodor, I., and Langridge, W.H. (2006). Suppression of hyperglycemia in NOD mice after inoculation with recombinant vaccinia viruses. *Mol Biotechnol* 34, 317-327.

## E

Efstratiadis, A. (1998). Genetics of mouse growth. *Int J Dev Biol* 42, 955-976.

Eggenschwiler, J., Ludwig, T., Fisher, P., Leighton, P.A., Tilghman, S.M., and Efstratiadis, A. (1997). Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith-Wiedemann and Simpson-Golabi-Behmel syndromes. *Genes Dev* 11, 3128-3142.

Eizirik, D., and Mandrup-Poulsen, T. (2001). A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 44, 2115-2133.

Eizirik, D., Strandell, E., Bendtzen, K., and Sandler, S. (1988). Functional characteristics of rat pancreatic islets maintained in culture after exposure to human interleukin 1. *Diabetes* 37, 916-919.

Eizirik, D., Welsh, M., Strandell, E., Welsh, N., and Sandler, S. (1990). 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.

Eizirik, D.L., Björklund, A., and Welsh, N. (1993). 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.

El-Shewy, H.M., Lee, M.H., Obeid, L.M., Jaffa, A.A., and Luttrell, L.M. (2007). The insulin-like growth factor type 1 and insulin-like growth factor type 2/mannose-6-phosphate receptors independently regulate ERK1/2 activity in HEK293 cells. *J Biol Chem* 282, 26150-26157.

Emamaullee, J.A., and Shapiro, A.M. (2006). Interventional strategies to prevent beta-cell apoptosis in islet transplantation. *Diabetes* 55, 1907-1914.

Emamaullee, J.A., and Shapiro, A.M. (2007). Factors influencing the loss of beta-cell mass in islet transplantation. *Cell Transplant* 16, 1-8.

Embury, J., Klein, D., Pileggi, A., Ribeiro, M., Jayaraman, S., Molano, R.D., Fraker, C., Kenyon, N., Ricordi, C., Inverardi, L., et al. (2001). Proteins linked to a protein transduction domain efficiently transduce pancreatic islets. *Diabetes* 50, 1706-1713.

Eto, K., Tsubamoto, Y., Terauchi, Y., Sugiyama, T., Kishimoto, T., Takahashi, N., Yamauchi, N., Kubota, N., Murayama, S., Aizawa, T., et al. (1999). Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Science* 283, 981-985.

## F

Fechner, H., Haack, A., Wang, H., Wang, X., Eizema, K., Pauschinger, M., Schoemaker, R., Veghel, R., Houtsmuller, A., Schultheiss, H.P., et al. (1999). Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther* 6, 1520-1535.

Fehmann, H.C., Jehle, P., Markus, U., and Göke, B. (1996). Functional active receptors for insulin-like growth factors-I (IGF-I) and IGF-II on insulin-, glucagon-, and somatostatin-producing cells. *Metabolism* 45, 759-766.

Fellous, T.G., Guppy, N.J., Brittan, M., and Alison, M.R. (2007). Cellular pathways to beta-cell replacement. *Diabetes Metab Res Rev* 23, 87-99.

Ferber, S., Halkin, A., Cohen, H., Ber, I., Einav, Y., Goldberg, I., Barshack, I., Seijffers, R., Kopolovic, J., Kaiser, N., et al. (2000). Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* 6, 568-572.

Fernandes, J.R., Duvivier-Kali, V.F., Keegan, M., Hollister-Lock, J., Omer, A., Su, S., Bonner-Weir, S., Feng, S., Lee, J.S., Mulligan, R.C., et al. (2004). Transplantation of islets transduced with CTLA4-Ig and TGFbeta using adenovirus and lentivirus vectors. *Transpl Immunol* 13, 191-200.

Ferrer-Garcia, J.C., Merino-Torres, J.F., Pérez Bermejo, G., Herrera-Vela, C., Ponce-Marco, J.L., and Piñon-Selles, F. (2003). Insulin-induced normoglycemia reduces islet number needed to achieve normoglycemia after allogeneic islet transplantation in diabetic mice. *Cell Transplant* 12, 849-857.

Field, A.E., Coakley, E.H., Must, A., Spadano, J.L., Laird, N., Dietz, W.H., Rimm, E., and Colditz, G.A. (2001). Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. *Arch Intern Med* 161, 1581-1586.

Fioretto, P., Steffes, M.W., Sutherland, D.E., Goetz, F.C., and Mauer, M. (1998). Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N Engl J Med* 339, 69-75.

Firth, S.M., and Baxter, R.C. (2002). Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 23, 824-854.

Flotte, T., Agarwal, A., Wang, J., Song, S., Fenjves, E.S., Inverardi, L., Chesnut, K., Afione, S., Loiler, S., Wasserfall, C., et al. (2001). Efficient ex vivo transduction of pancreatic islet cells with recombinant adeno-associated virus vectors. *Diabetes* 50, 515-520.

Fodor, A., Harel, C., Fodor, L., Armoni, M., Salmon, P., Trono, D., and Karnieli, E. (2007). Adult rat liver cells transdifferentiated with lentiviral IPF1 vectors reverse diabetes in mice: an ex vivo gene therapy approach. *Diabetologia* 50, 121-130.

Frasca, F., Pandini, G., Scalia, P., Sciacca, L., Mineo, R., Costantino, A., Goldfine, I.D., Belfiore, A., and Vigneri, R. (1999). Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol* 19, 3278-3288.

Freimuth, P., Springer, K., Berard, C., Hainfeld, J., Bewley, M., and Flanagan, J. (1999). Coxsackievirus and adenovirus receptor amino-terminal immunoglobulin V-related domain binds adenovirus type 2 and fiber knob from adenovirus type 12. *J Virol* 73, 1392-1398.

FROESCH, E.R., BUERGI, H., RAMSEIER, E.B., BALLY, P., and LABHART, A. (1963). ANTIBODY-SUPPRESSIBLE AND NONSUPPRESSIBLE INSULIN-LIKE ACTIVITIES IN HUMAN SERUM AND THEIR PHYSIOLOGIC SIGNIFICANCE. AN INSULIN ASSAY WITH ADIPOSE TISSUE OF INCREASED PRECISION AND SPECIFICITY. *J Clin Invest* 42, 1816-1834.

Fève, B., and Bastard, J.P. (2009). The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 5, 305-311.

## G

Gainer, A.L., Suarez-Pinzon, W.L., Min, W.P., Swiston, J.R., Hancock-Friesen, C., Korbitt, G.S., Rajotte, R.V., Warnock, G.L., and Elliott, J.F. (1998). Improved survival of biologically transfected mouse islet allografts expressing CTLA4-Ig or soluble Fas ligand. *Transplantation* 66, 194-199.

Gallagher, E.J., and LeRoith, D. (2010). The proliferating role of insulin and insulin-like growth factors in cancer. *Trends Endocrinol Metab* 21, 610-618.

Gallichan, W.S., Kafri, T., Krahl, T., Verma, I.M., and Sarvetnick, N. (1998). Lentivirus-mediated transduction of islet grafts with interleukin 4 results in sustained gene expression and protection from insulinitis. *Hum Gene Ther* 9, 2717-2726.

Gao, R., Ustinov, J., Korsgren, O., and Otonkoski, T. (2005). In vitro neogenesis of human islets reflects the plasticity of differentiated human pancreatic cells. *Diabetologia* 48, 2296-2304.

Garcia-Ocana, A., Takane, K.K., Reddy, V.T., Lopez-Talavera, J.C., Vasavada, R.C., and Stewart, A.F. (2003). 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.

Gerich, J.E. (2003). Contributions of insulin-resistance and insulin-secretory defects to the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc* 78, 447-456.

Gershengorn, M.C., Hardikar, A.A., Wei, C., Geras-Raaka, E., Marcus-Samuels, B., and Raaka, B.M. (2004). Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells. *Science* 306, 2261-2264.

Gerstein, H.C. (1994). Cow's milk exposure and type I diabetes mellitus. A critical overview of the clinical literature. *Diabetes Care* 17, 13-19.

Gianani, R. (2011). Beta cell regeneration in human pancreas. *Semin Immunopathol* 33, 23-27.

Gianani, R., Campbell-Thompson, M., Sarkar, S.A., Wasserfall, C., Pugliese, A., Solis, J.M., Kent, S.C., Hering, B.J., West, E., Steck, A., et al. (2010). Dimorphic histopathology of long-standing childhood-onset diabetes. *Diabetologia* 53, 690-698.

Giannoukakis, N., Mi, Z., Gambotto, A., Eramo, A., Ricordi, C., Trucco, M., and Robbins, P. (1999a). Infection of intact human islets by a lentiviral vector. *Gene Ther* 6, 1545-1551.

Giannoukakis, N., Mi, Z., Rudert, W., Gambotto, A., Trucco, M., and Robbins, P. (2000). Prevention of beta cell dysfunction and apoptosis activation in human islets by adenoviral gene transfer of the insulin-like growth factor I. *Gene Ther* 7, 2015-2022.

Giannoukakis, N., Rudert, W.A., Ghivizzani, S.C., Gambotto, A., Ricordi, C., Trucco, M., and Robbins, P.D. (1999b). Adenoviral gene transfer of the interleukin-1 receptor antagonist protein to human islets prevents IL-1 $\beta$ -induced beta-cell impairment and activation of islet cell apoptosis in vitro. *Diabetes* 48, 1730-1736.

Giannoukakis, N., Rudert, W.A., Robbins, P.D., and Trucco, M. (1999c). Targeting autoimmune diabetes with gene therapy. *Diabetes* 48, 2107-2121.

Giddings, S.J., Chirgwin, J., and Permutt, M.A. (1982). Effects of glucose on proinsulin messenger RNA in rats in vivo. *Diabetes* 31, 624-629.

Golden, B., Levin, L., Ban, Y., Concepcion, E., Greenberg, D.A., and Tomer, Y. (2005). Genetic analysis of families with autoimmune diabetes and thyroiditis: evidence for common and unique genes. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 4904-4911.

Goldstein, B.J., and Dudley, A.L. (1990). The rat insulin receptor: primary structure and conservation of tissue-specific alternative messenger RNA splicing. *Mol Endocrinol* 4, 235-244.

Gores, G.J., Herman, B., and Lemasters, J.J. (1990). Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. *Hepatology* 11, 690-698.

Gorus, F.K., Pipeleers, D.G., and Registry, B.D. (2001). Prospects for predicting and stopping the development of type 1 of diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 15, 371-389.

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.

Greig, N.H., Holloway, H.W., De Ore, K.A., Jani, D., Wang, Y., Zhou, J., Garant, M.J., and Egan, J.M. (1999). Once daily injection of exendin-4 to diabetic mice achieves long-term beneficial effects on blood glucose concentrations. *Diabetologia* 42, 45-50.

Grey, S.T., Arvelo, M.B., Hasenkamp, W., Bach, F.H., and Ferran, C. (1999). A20 inhibits cytokine-induced apoptosis and nuclear factor kappaB-dependent gene activation in islets. *J Exp Med* 190, 1135-1146.

Gruessner, A.C. (2011). 2011 update on pancreas transplantation: comprehensive trend analysis of 25,000 cases followed up over the course of twenty-four years at the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). *Rev Diabet Stud* 8, 6-16.

Gu, G., Dubauskaite, J., and Melton, D.A. (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129, 2447-2457.

Guest, C.B., Park, M.J., Johnson, D.R., and Freund, G.G. (2008). The implication of proinflammatory cytokines in type 2 diabetes. *Front Biosci* 13, 5187-5194.

Gysemans, C., Stoffels, K., Giulietti, A., Overbergh, L., Waer, M., Lannoo, M., Feige, U., and Mathieu, C. (2003). Prevention of primary non-function of islet xenografts in autoimmune diabetic NOD mice by anti-inflammatory agents. *Diabetologia* 46, 1115-1123.

## H

Halban, P.A., German, M.S., Kahn, S.E., and Weir, G.C. (2010). Current status of islet cell replacement and regeneration therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 1034-1043.

Hall, K., and Uthne, K. (1971). Some biological properties of purified sulfation factor (SF) from human plasma. *Acta Med Scand* 190, 137-143.

Hansen, B.F., Danielsen, G.M., Drejer, K., Sørensen, A.R., Wiberg, F.C., Klein, H.H., and Lundemose, A.G. (1996). Sustained signalling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogues exhibiting increased mitogenic potency. *Biochem J* 315 ( Pt 1), 271-279.

Haverkos, H.W. (1997). Could the aetiology of IDDM be multifactorial? *Diabetologia* 40, 1235-1240.

Hay, R.T., Freeman, A., Leith, I., Monaghan, A., and Webster, A. (1995). Molecular interactions during adenovirus DNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 199 ( Pt 2), 31-48.

Hearing, P., Samulski, R.J., Wishart, W.L., and Shenk, T. (1987). Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *J Virol* 61, 2555-2558.

Hill, D., Petrik, J., and Arany, E. (1998). Growth factors and the regulation of fetal growth. *Diabetes Care* 21 Suppl 2, B60-69.

Hill, D., Petrik, J., Arany, E., McDonald, T., and Delovitch, T. (1999). Insulin-like growth factors prevent cytokine-mediated cell death in isolated islets of Langerhans from pre-diabetic non-obese diabetic mice. *J Endocrinol* 161, 153-165.

Hill, D., Sedran, R., Brenner, S., and McDonald, T. (1997). IGF-I has a dual effect on insulin release from isolated, perfused adult rat islets of Langerhans. *J Endocrinol* 153, 15-25.

Hill, D., Strutt, B., Arany, E., Zaina, S., Coukell, S., and Graham, C. (2000). Increased and persistent circulating insulin-like growth factor II in neonatal transgenic mice suppresses developmental apoptosis in the pancreatic islets. *Endocrinology* 141, 1151-1157.

Hogg, J., Han, V., Clemmons, D., and Hill, D. (1993). Interactions of nutrients, insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in the regulation of DNA synthesis by isolated fetal rat islets of Langerhans. *J Endocrinol* 138, 401-412.

Honeyman, M.C., Coulson, B.S., Stone, N.L., Gellert, S.A., Goldwater, P.N., Steele, C.E., Couper, J.J., Tait, B.D., Colman, P.G., and Harrison, L.C. (2000). Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes* 49, 1319-1324.

Hoorens, A., Stangé, G., Pavlovic, D., and Pipeleers, D. (2001). Distinction between interleukin-1-induced necrosis and apoptosis of islet cells. *Diabetes* 50, 551-557.

Hoorens, A., Van de Casteele, M., Klöppel, G., and Pipeleers, D. (1996). Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program. *J Clin Invest* 98, 1568-1574.

Hsu, P.Y., Kotin, R.M., and Yang, Y.W. (2008). Glucose- and metabolically regulated hepatic insulin gene therapy for diabetes. *Pharm Res* 25, 1460-1468.

Huotari, M., Palgi, J., and Otonkoski, T. (1998). 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.

Hwa, V., Oh, Y., and Rosenfeld, R.G. (1999). The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20, 761-787.

Hügl, S., White, M., and Rhodes, C. (1998). Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells. *J Biol Chem* 273, 17771-17779.

## I

Ilieva, A., Yuan, S., Wang, R., Agapitos, D., Hill, D., and Rosenberg, L. (1999). Pancreatic islet cell survival following islet isolation: the role of cellular interactions in the pancreas. *J Endocrinol* 161, 357-364.

Ilvesmäki, V., Jäättelä, M., Saksela, E., and Voutilainen, R. (1993). Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma inhibit insulin-like growth factor II gene expression in human fetal adrenal cell cultures. *Mol Cell Endocrinol* 91, 59-65.

Inada, A., Nienaber, C., Katsuta, H., Fujitani, Y., Levine, J., Morita, R., Sharma, A., and Bonner-Weir, S. (2008). Carbonic anhydrase II-positive pancreatic cells are progenitors for both endocrine and exocrine pancreas after birth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19915-19919.

## J

Jahn, R., and Südhof, T.C. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* 68, 863-911.

Jahr, H., Hering, B.J., Brandhorst, H., Brandhorst, D., Bretzel, R.G., and Federlin, K. (1995). Isolated human pancreatic islets in vitro activate human complement. *Transplant Proc* 27, 3270.

Jahr, H., Pfeiffer, G., Hering, B.J., Federlin, K., and Bretzel, R.G. (1999). Endotoxin-mediated activation of cytokine production in human PBMCs by collagenase and Ficoll. *J Mol Med (Berl)* 77, 118-120.

Jensen, M., and De Meyts, P. (2009). Molecular mechanisms of differential intracellular signaling from the insulin receptor. *Vitam Horm* 80, 51-75.

Jones, J.I., and Clemmons, D.R. (1995). Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16, 3-34.

Ju, Q., Edelstein, D., Brendel, M.D., Brandhorst, D., Brandhorst, H., Bretzel, R.G., and Brownlee, M. (1998). Transduction of non-dividing adult human pancreatic beta cells by an integrating lentiviral vector. *Diabetologia* 41, 736-739.

Jørgensen, M.C., Ahnfelt-Rønne, J., Hald, J., Madsen, O.D., Serup, P., and Hecksher-Sørensen, J. (2007). An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocr Rev* 28, 685-705.

## K

Kaneto, H., Xu, G., Fujii, N., Kim, S., Bonner-Weir, S., and Weir, G.C. (2002). Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *J Biol Chem* 277, 30010-30018.

Kapturczak, M., Zolotukhin, S., Cross, J., Pileggi, A., Molano, R.D., Jorgensen, M., Byrne, B., Flotte, T.R., Ellis, T., Inverardi, L., et al. (2002). Transduction of human and mouse pancreatic islet cells using a bicistronic recombinant adeno-associated viral vector. *Mol Ther* 5, 154-160.

Kato, H., Faria, T.N., Stannard, B., Roberts, C.T., and LeRoith, D. (1994). Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor in IGF-I action. *Mol Endocrinol* 8, 40-50.

Kaufman, D., Rabe, F., Platt, J., Stock, P., and Sutherland, D. (1988). On the variability of outcome after islet allotransplantation. *Transplantation* 45, 1151-1153.

Kawahara, D.J., and Kenney, J.S. (1991). 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.

Kim, W.H., Lee, J.W., Suh, Y.H., Hong, S.H., Choi, J.S., Lim, J.H., Song, J.H., Gao, B., and Jung, M.H. (2005). 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.

Kiselyov, V.V., Versteyhe, S., Gauguin, L., and De Meyts, P. (2009). Harmonic oscillator model of the insulin and IGF1 receptors' allosteric binding and activation. *Mol Syst Biol* 5, 243.

Klein, D., Ricordi, C., Pugliese, A., and Pastori, R.L. (2000). Inhibition of Fas-mediated apoptosis in mouse insulinoma betaTC-3 cells via an anti-Fas ribozyme. *Hum Gene Ther* 11, 1033-1045.

Koizumi, M., Nagai, K., Kida, A., Kami, K., Ito, D., Fujimoto, K., Kawaguchi, Y., and Doi, R. (2006). Forced expression of PDX-1 induces insulin production in intestinal epithelia. *Surgery* 140, 273-280.

Kojima, S., Asakawa, A., Amitani, H., Sakoguchi, T., Ueno, N., Inui, A., and Kalra, S.P. (2009). Central leptin gene therapy, a substitute for insulin therapy to ameliorate hyperglycemia and hyperphagia, and promote survival in insulin-deficient diabetic mice. *Peptides* 30, 962-966.

Korsgren, O., Jansson, L., Sandler, S., and Andersson, A. (1990). Hyperglycemia-induced B cell toxicity. The fate of pancreatic islets transplanted into diabetic mice is dependent on their genetic background. *J Clin Invest* 86, 2161-2168.

Korsgren, O., Lundgren, T., Felldin, M., Foss, A., Isaksson, B., Permert, J., Persson, N., Rafael, E., Rydén, M., Salmela, K., et al. (2008). Optimising islet engraftment is critical for successful clinical islet transplantation. *Diabetologia* 51, 227-232.

Kroon, E., Martinson, L.A., Kadoya, K., Bang, A.G., Kelly, O.G., Eliazar, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N.G., Cunningham, J., et al. (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol* 26, 443-452.

Kubo, S., Saeki, Y., Chiocca, E.A., and Mitani, K. (2003). An HSV amplicon-based helper system for helper-dependent adenoviral vectors. *Biochem Biophys Res Commun* 307, 826-830.

Kukreja, A., and Maclaren, N.K. (1999). Autoimmunity and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 4371-4378.

Kulkarni, R.N., Brüning, J.C., Winnay, J.N., Postic, C., Magnuson, M.A., and Kahn, C.R. (1999). Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 96, 329-339.

Kulkarni, R.N., Holzenberger, M., Shih, D.Q., Ozcan, U., Stoffel, M., Magnuson, M.A., and Kahn, C.R. (2002). beta-cell-specific deletion of the Igf1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter beta-cell mass. *Nat Genet* 31, 111-115.

Kuno, K., and Matsushima, K. (1994). The IL-1 receptor signaling pathway. *J Leukoc Biol* 56, 542-547.

Kupila, A., Muona, P., Simell, T., Arvilommi, P., Savolainen, H., Hämäläinen, A.M., Korhonen, S., Kimpimäki, T., Sjöroos, M., Ilonen, J., et al. (2001). Feasibility of genetic and immunological prediction of type I diabetes in a population-based birth cohort. *Diabetologia* 44, 290-297.

## L

Lardon, J., Huyens, N., Rومان, I., and Bouwens, L. (2004). Exocrine cell transdifferentiation in dexamethasone-treated rat pancreas. *Virchows Arch* 444, 61-65.

Larsen, C., Faulenbach, M., Vaag, A., Vølund, A., Ehses, J., Seifert, B., Mandrup-Poulsen, T., and Donath, M. (2007). Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 356, 1517-1526.

Laviola, L., Natalicchio, A., and Giorgino, F. (2007). The IGF-I signaling pathway. *Curr Pharm Des* 13, 663-669.

Lawrence, M.C., McKern, N.M., and Ward, C.W. (2007). Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. *Curr Opin Struct Biol* 17, 699-705.

Leahy, J., and Vandekerkhove, K. (1990). Insulin-like growth factor-I at physiological concentrations is a potent inhibitor of insulin secretion. *Endocrinology* 126, 1593-1598.

Leahy, J.L. (2005). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 36, 197-209.

Lei, P., Ogunade, A., Kirkwood, K.L., Laychock, S.G., and Andreadis, S.T. (2007). Efficient production of bioactive insulin from human epidermal keratinocytes and tissue-engineered skin substitutes: implications for treatment of diabetes. *Tissue Eng* 13, 2119-2131.

Leibowitz, G., Beattie, G.M., Kafri, T., Cirulli, V., Lopez, A.D., Hayek, A., and Levine, F. (1999). Gene transfer to human pancreatic endocrine cells using viral vectors. *Diabetes* 48, 745-753.

LeRoith, D., Baserga, R., Helman, L., and Roberts, C.T. (1995). Insulin-like growth factors and cancer. *Ann Intern Med* 122, 54-59.

LeRoith, D., and Roberts, C.T. (1993). Insulin-like growth factors. *Ann N Y Acad Sci* 692, 1-9.

LeRoith, D., and Roberts, C.T. (2003). The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 195, 127-137.

Lifson, N., Kramlinger, K.G., Mayrand, R.R., and Lender, E.J. (1980). Blood flow to the rabbit pancreas with special reference to the islets of Langerhans. *Gastroenterology* 79, 466-473.

Lillioja, S., Mott, D.M., Spraul, M., Ferraro, R., Foley, J.E., Ravussin, E., Knowler, W.C., Bennett, P.H., and Bogardus, C. (1993). Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med* 329, 1988-1992.

Lin, T., Wang, D., Nagpal, M., and Chang, W. (1994). Recombinant murine tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and insulin-like growth factor-I gene expression in rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 101, 111-119.

Ling, Z., Chen, M.C., Smismans, A., Pavlovic, D., Schuit, F., Eizirik, D.L., and Pipeleers, D.G. (1998). Intercellular differences in interleukin 1 $\beta$ -induced suppression of insulin synthesis and stimulation of noninsulin protein synthesis by rat pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 139, 1540-1545.

Lingohr, M., Briaud, I., Dickson, L., McCuaig, J., Alárcon, C., Wicksteed, B., and Rhodes, C. (2006). Specific regulation of IRS-2 expression by glucose in rat primary pancreatic islet beta-cells. *J Biol Chem* 281, 15884-15892.

Liu, H., Guz, Y., Kedeas, M.H., Winkler, J., and Teitelman, G. (2010). Precursor cells in mouse islets generate new beta-cells in vivo during aging and after islet injury. *Endocrinology* 151, 520-528.

Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75, 59-72.

Liu, Y., Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W., Mukherjee, B., Brownlee, M., Edelstein, D., and Federoff, H.J. (1996). 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.

Ludwig, B., Rotem, A., Schmid, J., Weir, G.C., Colton, C.K., Brendel, M.D., Neufeld, T., Block, N.L., Yavriyants, K., Steffen, A., et al. (2012). Improvement of islet function in a bioartificial pancreas by enhanced oxygen supply and growth hormone releasing hormone agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 5022-5027.

## M

Mabley, J., Belin, V., John, N., and Green, I. (1997). Insulin-like growth factor I reverses interleukin-1beta inhibition of insulin secretion, induction of nitric oxide synthase and cytokine-mediated apoptosis in rat islets of Langerhans. *FEBS Lett* 417, 235-238.

Maechler, P., Carobbio, S., and Rubi, B. (2006). In beta-cells, mitochondria integrate and generate metabolic signals controlling insulin secretion. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 696-709.

Maedler, K., Fontana, A., Ris, F., Sergeev, P., Toso, C., Oberholzer, J., Lehmann, R., Bachmann, F., Tasinato, A., Spinas, G.A., et al. (2002a). 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.

Maedler, K., Schumann, D., Sauter, N., Ellingsgaard, H., Bosco, D., Baertschiger, R., Iwakura, Y., Oberholzer, J., Wollheim, C., Gauthier, B., et al. (2006a). Low concentration of interleukin-1beta induces FLICE-inhibitory protein-mediated beta-cell proliferation in human pancreatic islets. *Diabetes* 55, 2713-2722.

Maedler, K., Schumann, D.M., Schulthess, F., Oberholzer, J., Bosco, D., Berney, T., and Donath, M.Y. (2006b). Aging correlates with decreased beta-cell proliferative capacity and enhanced sensitivity to apoptosis: a potential role for Fas and pancreatic duodenal homeobox-1. *Diabetes* 55, 2455-2462.

Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H.I., Spinas, G.A., Kaiser, N., Halban, P.A., and Donath, M.Y. (2002b). Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 110, 851-860.

Maedler, K., Spinas, G., Lehmann, R., Sergeev, P., Weber, M., Fontana, A., Kaiser, N., and Donath, M. (2001). Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes* 50, 1683-1690.

Maehr, R., Chen, S., Snitow, M., Ludwig, T., Yagasaki, L., Goland, R., Leibel, R.L., and Melton, D.A. (2009). Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15768-15773.

Maguire, A.M., High, K.A., Auricchio, A., Wright, J.F., Pierce, E.A., Testa, F., Mingozzi, F., Bencicelli, J.L., Ying, G.S., Rossi, S., et al. (2009). Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet* 374, 1597-1605.

Major, C.D., and Wolf, B.A. (2001). Interleukin-1beta stimulation of c-Jun NH(2)-terminal kinase activity in insulin-secreting cells: evidence for cytoplasmic restriction. *Diabetes* 50, 2721-2728.

Mandrup-Poulsen, T. (1996). The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 39, 1005-1029.

Mandrup-Poulsen, T., Bendtzen, K., Nerup, J., Dinarello, C.A., Svenson, M., and Nielsen, J.H. (1986). Affinity-purified human interleukin I is cytotoxic to isolated islets of Langerhans. *Diabetologia* 29, 63-67.

Mandrup-Poulsen, T., Bendtzen, K., Nielsen, J.H., Bendixen, G., and Nerup, J. (1985). Cytokines cause functional and structural damage to isolated islets of Langerhans. *Allergy* 40, 424-429.

Marks, A.G., Carroll, J.M., Purnell, J.Q., and Roberts, C.T. (2011). Plasma distribution and signaling activities of IGF-II precursors. *Endocrinology* 152, 922-930.

Martin, D., Carlson, R., and Feldman, E. (1993). Interferon-gamma inhibits DNA synthesis and insulin-like growth factor-II expression in human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 34, 489-501.

Mathis, D., Vence, L., and Benoist, C. (2001). beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature* 414, 792-798.

Matthews, D.A., and Russell, W.C. (1995). 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.

McDaniel, M.L., Kwon, G., Hill, J.R., Marshall, C.A., and Corbett, J.A. (1996). Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med* 211, 24-32.

Meagher, C., Arreaza, G., Peters, A., Strathdee, C.A., Gilbert, P.A., Mi, Q.S., Santamaria, P., Dekaban, G.A., and Delovitch, T.L. (2007). CCL4 protects from type 1 diabetes by altering islet beta-cell-targeted inflammatory responses. *Diabetes* 56, 809-817.

Meier, J.J., Bhushan, A., Butler, A.E., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2005). Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? *Diabetologia* 48, 2221-2228.

Meier, J.J., Butler, A.E., Saisho, Y., Monchamp, T., Galasso, R., Bhushan, A., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2008). Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans. *Diabetes* 57, 1584-1594.

Mellgren, A., Schnell Landström, A.H., Petersson, B., and Andersson, A. (1986). The renal subcapsular site offers better growth conditions for transplanted mouse pancreatic islet cells than the liver or spleen. *Diabetologia* 29, 670-672.

Melloul, D., Marshak, S., and Cerasi, E. (2002). Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45, 309-326.

Menger, M.D., Yamauchi, J., and Vollmar, B. (2001). Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. *World J Surg* 25, 509-515.

Mentel, R., Döpping, G., Wegner, U., Seidel, W., Liebermann, H., and Döhner, L. (1997). Adenovirus-receptor interaction with human lymphocytes. *J Med Virol* 51, 252-257.

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

Merino, J., Nacher, V., Raurell, M., Biarnés, M., Soler, J., and Montanya, E. Optimal insulin treatment in syngeneic islet transplantation. *Cell Transplant* 9, 11-18.

Mi, Z., Mai, J., Lu, X., and Robbins, P.D. (2000). Characterization of a class of cationic peptides able to facilitate efficient protein transduction in vitro and in vivo. *Mol Ther* 2, 339-347.

Miki, T., Nagashima, K., and Seino, S. (1999). The structure and function of the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in insulin-secreting pancreatic beta-cells. *J Mol Endocrinol* 22, 113-123.

Minami, K., Okano, H., Okumachi, A., and Seino, S. (2008). Role of cadherin-mediated cell-cell adhesion in pancreatic exocrine-to-endocrine transdifferentiation. *J Biol Chem* 283, 13753-13761.

Mingozi, F., and High, K.A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* 12, 341-355.

Miralles, F., Lamotte, L., Couton, D., and Joshi, R.L. (2006). Interplay between FGF10 and Notch signalling is required for the self-renewal of pancreatic progenitors. *Int J Dev Biol* 50, 17-26.

Mokdad, A.H., Bowman, B.A., Ford, E.S., Vinicor, F., Marks, J.S., and Koplan, J.P. (2001). The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA* 286, 1195-1200.

Moller, D.E., Yokota, A., Caro, J.F., and Flier, J.S. (1989). Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol Endocrinol* 3, 1263-1269.

Montanya, E., Nacher, V., Biarnés, M., and Soler, J. (2000). 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.

Montanya, E., and Téllez, N. (2009). Pancreatic remodeling: beta-cell apoptosis, proliferation and neogenesis, and the measurement of beta-cell mass and of individual beta-cell size. *Methods Mol Biol* 560, 137-158.

Montaña, E., Bonner-Weir, S., and Weir, G.C. (1994). Transplanted beta cell response to increased metabolic demand. Changes in beta cell replication and mass. *J Clin Invest* 93, 1577-1582.

Montolio, M., Biarnés, M., Téllez, N., Escoriza, J., Soler, J., and Montanya, E. (2007a). Interleukin-1beta and inducible form of nitric oxide synthase expression in early syngeneic islet transplantation. *J Endocrinol* 192, 169-177.

Montolio, M., Téllez, N., Biarnés, M., Soler, J., and Montanya, E. (2005). 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.

Montolio, M., Téllez, N., Soler, J., and Montanya, E. (2007b). Role of blood glucose in cytokine gene expression in early syngeneic islet transplantation. *Cell Transplant* 16, 517-525.

Moriscot, C., Pattou, F., Kerr-Conte, J., Richard, M.J., Lemarchand, P., and Benhamou, P.Y. (2000). 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.

Muller, D., Huang, G.C., Amiel, S., Jones, P.M., and Persaud, S.J. (2007). Gene expression heterogeneity in human islet endocrine cells in vitro: the insulin signalling cascade. *Diabetologia* 50, 1239-1242.

Muruve, D.A., Manfro, R.C., Strom, T.B., and Libermann, T.A. (1997). Ex vivo adenovirus-mediated gene delivery leads to long-term expression in pancreatic islet transplants. *Transplantation* 64, 542-546.

Myers, M.A., Mackay, I.R., Rowley, M.J., and Zimmet, P.Z. (2001). Dietary microbial toxins and type 1 diabetes--a new meaning for seed and soil. *Diabetologia* 44, 1199-1200.

## N

Nacher, V., Merino, J., Raurell, M., Soler, J., and Montanya, E. (1998). Normoglycemia restores beta-cell replicative response to glucose in transplanted islets exposed to chronic hyperglycemia. *Diabetes* 47, 192-196.

Naftanel, M.A., and Harlan, D.M. (2004). Pancreatic islet transplantation. *PLoS Med* 1, e58; quiz e75.

Nakae, J., Kido, Y., and Accili, D. (2001). Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr Rev* 22, 818-835.

Nam, T., Moralez, A., and Clemmons, D. (2002). Vitronectin binding to IGF binding protein-5 (IGFBP-5) alters IGFBP-5 modulation of IGF-I actions. *Endocrinology* 143, 30-36.

Nandi, A., Kitamura, Y., Kahn, C.R., and Accili, D. (2004). Mouse models of insulin resistance. *Physiol Rev* 84, 623-647.

Narasimhan, S.D., Yen, K., and Tissenbaum, H.A. (2009). Converging pathways in lifespan regulation. *Curr Biol* 19, R657-666.

Nathwani, A.C., Tuddenham, E.G., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D.C., Chowdary, P., Riddell, A., Pie, A.J., Harrington, C., et al. (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 365, 2357-2365.

Navarro, M., and Baserga, R. (2001). Limited redundancy of survival signals from the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Endocrinology* 142, 1073-1081.

Navarro, X., Sutherland, D.E., and Kennedy, W.R. (1997). Long-term effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy. *Ann Neurol* 42, 727-736.

Neuenschwander, S., Schwartz, A., Wood, T.L., Roberts, C.T., Hennighausen, L., and LeRoith, D. (1996). Involution of the lactating mammary gland is inhibited by the IGF system in a transgenic mouse model. *J Clin Invest* 97, 2225-2232.

Newgard, C.B., and McGarry, J.D. (1995). Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem* 64, 689-719.

Nielsen, D.A., Welsh, M., Casadaban, M.J., and Steiner, D.F. (1985). Control of insulin gene expression in pancreatic beta-cells and in an insulin-producing cell line, RIN-5F cells. I. Effects of glucose and cyclic AMP on the transcription of insulin mRNA. *J Biol Chem* 260, 13585-13589.

Nielsen, J., Christiansen, J., Lykke-Andersen, J., Johnsen, A., Wewer, U., and Nielsen, F. (1999). A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol Cell Biol* 19, 1262-1270.

Nielsen, J.H., Brunstedt, J., Andersson, A., and Frimodt-Møller, C. (1979). Preservation of beta cell function in adult human pancreatic islets for several months in vitro. *Diabetologia* 16, 97-100.

Nir, T., Melton, D., and Dor, Y. (2007). Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. *J Clin Invest* 117, 2553-2561.

Nissley, P., and Lopaczynski, W. (1991). Insulin-like growth factor receptors. *Growth Factors* 5, 29-43.

Niu, L., Xu, Y.C., Dai, Z., and Tang, H.Q. (2008). Gene therapy for type 1 diabetes mellitus in rats by gastrointestinal administration of chitosan nanoparticles containing human insulin gene. *World J Gastroenterol* 14, 4209-4215.

## O

O'Connor, R., Kauffmann-Zeh, A., Liu, Y., Lehar, S., Evan, G.I., Baserga, R., and Blättler, W.A. (1997). Identification of domains of the insulin-like growth factor I receptor that are required for protection from apoptosis. *Mol Cell Biol* 17, 427-435.

O'Neill, L.A. (1995). Towards an understanding of the signal transduction pathways for interleukin 1. *Biochim Biophys Acta* 1266, 31-44.

Okada, T., Liew, C., Hu, J., Hinault, C., Michael, M., Krtzfeldt, J., Yin, C., Holzenberger, M., Stoffel, M., and Kulkarni, R. (2007). Insulin receptors in beta-cells are critical for islet compensatory growth response to insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8977-8982.

Oliver-Krasinski, J.M., and Stoffers, D.A. (2008). On the origin of the beta cell. *Genes Dev* 22, 1998-2021.

Olson, D.E., Campbell, A.G., Porter, M.H., Freeman, K.G., Kelso, E., Flatt, W.P., and Thulé, P.M. (2008). Hepatic insulin gene therapy normalizes diurnal fluctuation of oxidative metabolism in diabetic BB/Wor rats. *Mol Ther* 16, 1235-1242.

Opal, S.M., and DePalo, V.A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117, 1162-1172.

Orci, L. (1982). Macro- and micro-domains in the endocrine pancreas. *Diabetes* 31, 538-565.

Otonkoski, T., Beattie, G.M., Rubin, J.S., Lopez, A.D., Baird, A., and Hayek, A. (1994). Hepatocyte growth factor/scatter factor has insulinotropic activity in human fetal pancreatic cells. *Diabetes* 43, 947-953.

Otonkoski, T., Cirulli, V., Beattie, M., Mally, M.I., Soto, G., Rubin, J.S., and Hayek, A. (1996). A role for hepatocyte growth factor/scatter factor in fetal mesenchyme-induced pancreatic beta-cell growth. *Endocrinology* 137, 3131-3139.

Ouziel-Yahalom, L., Zalzman, M., Anker-Kitai, L., Knoller, S., Bar, Y., Glandt, M., Herold, K., and Efrat, S. (2006). Expansion and redifferentiation of adult human pancreatic islet cells. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 291-298.

Ozasa, T., Newton, M.R., Dallman, M.J., Shimizu, S., Gray, D.W., and Morris, P.J. (1997). Cytokine gene expression in pancreatic islet grafts in the rat. *Transplantation* 64, 1152-1159.

## P

Pache, L., Venkataraman, S., Nemerow, G.R., and Reddy, V.S. (2008). Conservation of fiber structure and CD46 usage by subgroup B2 adenoviruses. *Virology* 375, 573-579.

Pakhomov, O., Honiger, J., Gouin, E., Cariolet, R., Reach, G., and Darquy, S. (2002). Insulin treatment of mice recipients preserves beta-cell function in porcine islet transplantation. *Cell Transplant* 11, 721-728.

Palmer, J.P., Helqvist, S., Spinas, G.A., Mølviq, J., Mandrup-Poulsen, T., Andersen, H.U., and Nerup, J. (1989). Interaction of beta-cell activity and IL-1 concentration and exposure time in isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* 38, 1211-1216.

Pandini, G., Medico, E., Conte, E., Sciacca, L., Vigneri, R., and Belfiore, A. (2003). Differential gene expression induced by insulin and insulin-like growth factor-II through the insulin receptor isoform A. *J Biol Chem* 278, 42178-42189.

Paraskevas, S., Aikin, R., Maysinger, D., Lakey, J.R., Cavanagh, T.J., Agapitos, D., Wang, R., and Rosenberg, L. (2001). Modulation of JNK and p38 stress activated protein kinases in isolated islets of Langerhans: insulin as an autocrine survival signal. *Ann Surg* 233, 124-133.

Parks, R.J., Chen, L., Anton, M., Sankar, U., Rudnicki, M.A., and Graham, F.L. (1996). 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.

Parnaud, G., Bosco, D., Berney, T., Pattou, F., Kerr-Conte, J., Donath, M., Bruun, C., Mandrup-Poulsen, T., Billestrup, N., and Halban, P. (2008). Proliferation of sorted human and rat beta cells. *Diabetologia* 51, 91-100.

Parsons, J.A., Bartke, A., and Sorenson, R.L. (1995). 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.

Parsons, J.A., Brelje, T.C., and Sorenson, R.L. (1992). 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.

Parsons, M.J., Pisharath, H., Yusuff, S., Moore, J.C., Siekmann, A.F., Lawson, N., and Leach, S.D. (2009). Notch-responsive cells initiate the secondary transition in larval zebrafish pancreas. *Mech Dev* 126, 898-912.

Pavlovic, D., Chen, M.C., Gysemans, C.A., Mathieu, C., and Eizirik, D.L. (1999). 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.

Payet, L.D., Firth, S.M., and Baxter, R.C. (2004). The role of the acid-labile subunit in regulating insulin-like growth factor transport across human umbilical vein endothelial cell monolayers. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2382-2389.

Pende, M., Kozma, S.C., Jaquet, M., Oorschot, V., Burcelin, R., Le Marchand-Brustel, Y., Klumperman, J., Thorens, B., and Thomas, G. (2000). Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature* 408, 994-997.

Perfetti, R., and Hui, H. (2004). The role of GLP-1 in the life and death of pancreatic beta cells. *Horm Metab Res* 36, 804-810.

Perl, S., Kushner, J.A., Buchholz, B.A., Meeker, A.K., Stein, G.M., Hsieh, M., Kirby, M., Pechhold, S., Liu, E.H., Harlan, D.M., et al. (2010). Significant human beta-cell turnover is

limited to the first three decades of life as determined by in vivo thymidine analog incorporation and radiocarbon dating. *J Clin Endocrinol Metab* 95, E234-239.

Persson, B.D., Reiter, D.M., Marttila, M., Mei, Y.F., Casasnovas, J.M., Arnberg, N., and Stehle, T. (2007). Adenovirus type 11 binding alters the conformation of its receptor CD46. *Nat Struct Mol Biol* 14, 164-166.

Petrik, J., Arany, E., McDonald, T., and Hill, D. (1998). Apoptosis in the pancreatic islet cells of the neonatal rat is associated with a reduced expression of insulin-like growth factor II that may act as a survival factor. *Endocrinology* 139, 2994-3004.

Petrik, J., Pell, J., Arany, E., McDonald, T., Dean, W., Reik, W., and Hill, D. (1999a). Overexpression of insulin-like growth factor-II in transgenic mice is associated with pancreatic islet cell hyperplasia. *Endocrinology* 140, 2353-2363.

Petrik, J., Reusens, B., Arany, E., Remacle, C., Coelho, C., Hoet, J., and Hill, D. (1999b). A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology* 140, 4861-4873.

Pipeleers, D., Keymeulen, B., Chatenoud, L., Hendrieckx, C., Ling, Z., Mathieu, C., Roep, B., and Ysebaert, D. (2002). A view on beta cell transplantation in diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 958, 69-76.

Pirot, P., Cardozo, A.K., and Eizirik, D.L. (2008). Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 52, 156-165.

Piston, D.W., Knobel, S.M., Postic, C., Shelton, K.D., and Magnuson, M.A. (1999). Adenovirus-mediated knockout of a conditional glucokinase gene in isolated pancreatic islets reveals an essential role for proximal metabolic coupling events in glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* 274, 1000-1004.

Pollak, M. (2008). Insulin, insulin-like growth factors and neoplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22, 625-638.

Prentki, M., and Nolan, C.J. (2006). Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116, 1802-1812.

Prentki, M., Tornheim, K., and Corkey, B.E. (1997). Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. *Diabetologia* 40 Suppl 2, S32-41.

## Q

Qiu, Q., Jiang, J.Y., Bell, M., Tsang, B.K., and Gruslin, A. (2007). Activation of endoproteolytic processing of insulin-like growth factor-II in fetal, early postnatal, and pregnant rats and persistence of circulating levels in postnatal life. *Endocrinology* 148, 4803-4811.

## R

Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W., Strynadka, K., Ju, Q., Edelstein, D., Brownlee, M., Korbitt, G.S., and Rajotte, R.V. (1999). Transfection of human pancreatic islets with an anti-apoptotic gene (bcl-2) protects beta-cells from cytokine-induced destruction. *Diabetes* 48, 1223-1229.

Rabinovitch, A., and Suarez-Pinzon, W.L. (2003). Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord* 4, 291-299.

Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W.L., Shi, Y., Morgan, A.R., and Bleackley, R.C. (1994). DNA fragmentation is an early event in cytokine-induced islet beta-cell destruction. *Diabetologia* 37, 733-738.

Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R.M., Sempoux, C., and Henquin, J.C. (2008). Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4, 32-42.

Raile, K., Berthold, A., Banning, U., Horn, F., Pfeiffer, G., and Kiess, W. (2003). IGFs, basic FGF, and glucose modulate proliferation and apoptosis induced by IFN $\gamma$  but not by IL-1 $\beta$  in rat INS-1E beta-cells. *Horm Metab Res* 35, 407-414.

Raurell, M., Merino, J., Nacher, V., Biarnés, M., Soler, J., and Montanya, E. (1999). Preserved beta cell function with insulin treatment in islet transplantation: effect on insulin gene expression. *Transplant Proc* 31, 2561.

Redondo, M.J., and Eisenbarth, G.S. (2002). Genetic control of autoimmunity in Type I diabetes and associated disorders. *Diabetologia* 45, 605-622.

Reers, C., Erbel, S., Esposito, I., Schmied, B., Büchler, M.W., Nawroth, P.P., and Ritzel, R.A. (2009). Impaired islet turnover in human donor pancreata with aging. *Eur J Endocrinol* 160, 185-191.

Rehman, K.K., Bertera, S., Bottino, R., Balamurugan, A.N., Mai, J.C., Mi, Z., Trucco, M., and Robbins, P.D. (2003). Protection of islets by in situ peptide-mediated transduction of the I $\kappa$ B kinase inhibitor Nemo-binding domain peptide. *J Biol Chem* 278, 9862-9868.

Rekosh, D.M., Russell, W.C., Bellet, A.J., and Robinson, A.J. (1977). Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. *Cell* 11, 283-295.

Ren, B., O'Brien, B.A., Swan, M.A., Koina, M.E., Nassif, N., Wei, M.Q., and Simpson, A.M. (2007). Long-term correction of diabetes in rats after lentiviral hepatic insulin gene therapy. *Diabetologia* 50, 1910-1920.

Rewers, M., Bugawan, T.L., Norris, J.M., Blair, A., Beaty, B., Hoffman, M., McDuffie, R.S., Hamman, R.F., Klingensmith, G., Eisenbarth, G.S., et al. (1996). Newborn screening for HLA markers associated with IDDM: diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *Diabetologia* 39, 807-812.

Rezania, A., Bruin, J.E., Riedel, M.J., Mojibian, M., Asadi, A., Xu, J., Gauvin, R., Narayan, K., Karanu, F., O'Neil, J.J., et al. (2012). Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice. *Diabetes* 61, 2016-2029.

Rhodes, C.J. (2000). Introduction: the molecular cell biology of insulin production. *Semin Cell Dev Biol* 11, 223-225.

Rhodes, C.J., and Alarcón, C. (1994). What beta-cell defect could lead to hyperproinsulinemia in NIDDM? Some clues from recent advances made in understanding the proinsulin-processing mechanism. *Diabetes* 43, 511-517.

Ricordi, C., Tzakis, A.G., Carroll, P.B., Zeng, Y.J., Rilo, H.L., Alejandro, R., Shapiro, A., Fung, J.J., Demetris, A.J., and Mintz, D.H. (1992). Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. *Transplantation* 53, 407-414.

Rinderknecht, E., and Humbel, R.E. (1976a). Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: evidence for structural homology with insulin B chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 4379-4381.

Rinderknecht, E., and Humbel, R.E. (1976b). Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 2365-2369.

Rinderknecht, E., and Humbel, R.E. (1978a). Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* 89, 283-286.

Rinderknecht, E., and Humbel, R.E. (1978b). The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253, 2769-2776.

Risbud, M.V., and Shapiro, I.M. (2014). Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. *Nat Rev Rheumatol* 10, 44-56.

Robitaille, R., Dusseault, J., Henley, N., Rosenberg, L., and Hallé, J. (2003). Insulin-like growth factor II allows prolonged blood glucose normalization with a reduced islet cell mass transplantation. *Endocrinology* 144, 3037-3045.

Robles, D.T., and Eisenbarth, G.S. (2001). Type 1A diabetes induced by infection and immunization. *J Autoimmun* 16, 355-362.

Rodríguez-Mulero, S., and Montanya, E. (2008). Islet graft response to transplantation injury includes upregulation of protective as well as apoptotic genes. *Cell Transplant* 17, 1025-1034.

Roelvink, P.W., Lizonova, A., Lee, J.G., Li, Y., Bergelson, J.M., Finberg, R.W., Brough, D.E., Kovsdi, I., and Wickham, T.J. (1998). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol* 72, 7909-7915.

Rooman, I., and Bouwens, L. (2004). Combined gastrin and epidermal growth factor treatment induces islet regeneration and restores normoglycaemia in C57Bl6/J mice treated with alloxan. *Diabetologia* 47, 259-265.

Rooman, I., Heremans, Y., Heimberg, H., and Bouwens, L. (2000). Modulation of rat pancreatic acinoductal transdifferentiation and expression of PDX-1 in vitro. *Diabetologia* 43, 907-914.

Rooman, I., Lardon, J., and Bouwens, L. (2002). Gastrin stimulates beta-cell neogenesis and increases islet mass from transdifferentiated but not from normal exocrine pancreas tissue. *Diabetes* 51, 686-690.

Rosenberg, L., Brown, R.A., and Duguid, W.P. (1983). A new approach to the induction of duct epithelial hyperplasia and nesidioblastosis by cellophane wrapping of the hamster pancreas. *J Surg Res* 35, 63-72.

ROWE, W.P., HUEBNER, R.J., GILMORE, L.K., PARROTT, R.H., and WARD, T.G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 84, 570-573.

Russ, H.A., Bar, Y., Ravassard, P., and Efrat, S. (2008). In vitro proliferation of cells derived from adult human beta-cells revealed by cell-lineage tracing. *Diabetes* 57, 1575-1583.

Russ, H.A., Ravassard, P., Kerr-Conte, J., Pattou, F., and Efrat, S. (2009). Epithelial-mesenchymal transition in cells expanded in vitro from lineage-traced adult human pancreatic beta cells. *PLoS One* 4, e6417.

Russ, H.A., Sintov, E., Anker-Kitai, L., Friedman, O., Lenz, A., Toren, G., Farhy, C., Pasmanik-Chor, M., Oron-Karni, V., Ravassard, P., et al. (2011). Insulin-producing cells generated from dedifferentiated human pancreatic beta cells expanded in vitro. *PLoS One* 6, e25566.

Russell, W.C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 81, 2573-2604.

Russell, W.C. (2009). Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol* 90, 1-20.

Rutter, G.A., Burnett, P., Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., Pozzan, T., Tavaré, J.M., and Denton, R.M. (1996). Subcellular imaging of intramitochondrial Ca<sup>2+</sup> with recombinant targeted aequorin: significance for the regulation of pyruvate dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5489-5494.

Ryan, E., Paty, B., Senior, P., Bigam, D., Alfadhli, E., Kneteman, N., Lakey, J., and Shapiro, A. (2005). Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 54, 2060-2069.

## S

Saban, S.D., Nepomuceno, R.R., Gritton, L.D., Nemerow, G.R., and Stewart, P.L. (2005). CryoEM structure at 9Å resolution of an adenovirus vector targeted to hematopoietic cells. *J Mol Biol* 349, 526-537.

Sadeghi, H., Bregenholt, S., Wegmann, D., Petersen, J.S., Holmgren, J., and Lebens, M. (2002). Genetic fusion of human insulin B-chain to the B-subunit of cholera toxin enhances in vitro antigen presentation and induction of bystander suppression in vivo. *Immunology* 106, 237-245.

Sadowski, T., Dietrich, S., Müller, M., Havlickova, B., Schunck, M., Proksch, E., Müller, M.S., and Sedlacek, R. (2003). Matrix metalloproteinase-19 expression in normal and diseased skin: dysregulation by epidermal proliferation. *J Invest Dermatol* 121, 989-996.

Saldeen, J. (2000). Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common Bcl-2-inhibitable pathway in rat insulin-producing cells. *Endocrinology* 141, 2003-2010.

SALMON, W.D., and DAUGHADAY, W.H. (1957). A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 49, 825-836.

Salmon, W.D., and DuVall, M.R. (1970). In vitro stimulation of leucine incorporation into muscle and cartilage protein by a serum fraction with sulfation factor activity: differentiation of effects from those of growth hormone and insulin. *Endocrinology* 87, 1168-1180.

Salveti, M., Ristori, G., Bomprezzi, R., Pozzilli, P., and Leslie, R.D. (2000). Twins: mirrors of the immune system. *Immunol Today* 21, 342-347.

Samani, A.A., Yakar, S., LeRoith, D., and Brodt, P. (2007). The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev* 28, 20-47.

San Martín, C., Glasgow, J.N., Borovjagin, A., Beatty, M.S., Kashentseva, E.A., Curiel, D.T., Marabini, R., and Dmitriev, I.P. (2008). Localization of the N-terminus of minor coat protein IIIa in the adenovirus capsid. *J Mol Biol* 383, 923-934.

Sapir, T., Shternhall, K., Meivar-Levy, I., Blumenfeld, T., Cohen, H., Skutelsky, E., Eventov-Friedman, S., Barshack, I., Goldberg, I., Pri-Chen, S., et al. (2005). Cell-replacement therapy for diabetes: Generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7964-7969.

Sathyapalan, T., and Atkin, S.L. (2011). Is there a role for immune and anti-inflammatory therapy in type 2 diabetes? *Minerva Endocrinol* 36, 147-156.

Saxena, R., Voight, B., Lyssenko, V., Burt, N., de Bakker, P., Chen, H., Roix, J., Kathiresan, S., Hirschhorn, J., Daly, M., et al. (2007). Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316, 1331-1336.

Scaglia, L., Cahill, C., Finegood, D., and Bonner-Weir, S. (1997). Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology* 138, 1736-1741.

Scaglia, L., Smith, F.E., and Bonner-Weir, S. (1995). Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology* 136, 5461-5468.

Scarim, A., Heitmeier, M., and Corbett, J. (1997). Irreversible inhibition of metabolic function and islet destruction after a 36-hour exposure to interleukin-1beta. *Endocrinology* 138, 5301-5307.

Scharfmann, R., Duvillie, B., Stetsyuk, V., Attali, M., Filhoulaud, G., and Guillemain, G. (2008). Beta-cell development: the role of intercellular signals. *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4, 195-200.

Scharp, D.W., Lacy, P.E., Weide, L.G., Marchetti, P., McCullough, C.S., Flavin, K., and Santiago, J.V. (1991). Intraportal islet allografts: the use of a stimulation index to represent functional results. *Transplant Proc* 23, 796-798.

Schrezenmeir, J., and Jagla, A. (2000). Milk and diabetes. *J Am Coll Nutr* 19, 176S-190S.

Schulz, T.C., Young, H.Y., Agulnick, A.D., Babin, M.J., Baetge, E.E., Bang, A.G., Bhoumik, A., Cepa, I., Cesario, R.M., Haakmeester, C., et al. (2012). A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS One* 7, e37004.

Scott, C.D., and Firth, S.M. (2004). The role of the M6P/IGF-II receptor in cancer: tumor suppression or garbage disposal? *Horm Metab Res* 36, 261-271.

Scott, L., Mohlke, K., Bonnycastle, L., Willer, C., Li, Y., Duren, W., Erdos, M., Stringham, H., Chines, P., Jackson, A., et al. (2007). A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316, 1341-1345.

Shapiro, A., Lakey, J., Ryan, E., Korbitt, G., Toth, E., Warnock, G., Kneteman, N., and Rajotte, R. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343, 230-238.

Shapiro, A.M., Ricordi, C., Hering, B.J., Auchincloss, H., Lindblad, R., Robertson, R.P., Secchi, A., Brendel, M.D., Berney, T., Brennan, D.C., et al. (2006). International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 355, 1318-1330.

Sharma, A., Zangen, D.H., Reitz, P., Taneja, M., Lissauer, M.E., Miller, C.P., Weir, G.C., Habener, J.F., and Bonner-Weir, S. (1999). The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. *Diabetes* 48, 507-513.

Shternhall-Ron, K., Quintana, F.J., Perl, S., Meivar-Levy, I., Barshack, I., Cohen, I.R., and Ferber, S. (2007). Ectopic PDX-1 expression in liver ameliorates type 1 diabetes. *J Autoimmun* 28, 134-142.

Sjöholm, A. (1991). Inhibition of fetal rat pancreatic beta-cell replication by interleukin-1 beta in vitro is not mediated through pertussis toxin-sensitive G-proteins, a decrease in cyclic AMP, or protease activation. *FEBS Lett* 289, 249-252.

Sjöholm, A. (1992). Differential effects of cytokines on long-term mitogenic and secretory responses of fetal rat pancreatic beta-cells. *Am J Physiol* 263, C114-120.

Sjöholm, A., Welsh, N., Sandler, S., and Hellerström, C. (1990). Role of polyamines in mitogenic and secretory responses of pancreatic beta-cells to growth factors. *Am J Physiol* 259, C828-833.

Smith, A.C., Choufani, S., Ferreira, J.C., and Weksberg, R. (2007). Growth regulation, imprinted genes, and chromosome 11p15.5. *Pediatr Res* 61, 43R-47R.

Solar, M., Cardalda, C., Houbracken, I., Martín, M., Maestro, M.A., De Medts, N., Xu, X., Grau, V., Heimberg, H., Bouwens, L., et al. (2009). Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth. *Dev Cell* 17, 849-860.

Soltani, N., Kumar, M., Glinka, Y., Prud'homme, G.J., and Wang, Q. (2007). In vivo expression of GLP-1/IgG-Fc fusion protein enhances beta-cell mass and protects against streptozotocin-induced diabetes. *Gene Ther* 14, 981-988.

Soos, M.A., Whittaker, J., Lammers, R., Ullrich, A., and Siddle, K. (1990). Receptors for insulin and insulin-like growth factor-I can form hybrid dimers. Characterisation of hybrid receptors in transfected cells. *Biochem J* 270, 383-390.

Southern, C., Schulster, D., and Green, I. (1990a). 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.

Southern, C., Schulster, D., and Green, I. (1990b). 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.

Spinas, G., Palmer, J., Mandrup-Poulsen, T., Andersen, H., Nielsen, J., and Nerup, J. (1988). The bimodal effect of interleukin 1 on rat pancreatic beta-cells--stimulation followed by inhibition--depends upon dose, duration of exposure, and ambient glucose concentration. *Acta Endocrinol (Copenh)* 119, 307-311.

Stassi, G., De Maria, R., Trucco, G., Rudert, W., Testi, R., Galluzzo, A., Giordano, C., and Trucco, M. (1997). Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 186, 1193-1200.

Steiner, D.F., Chan, S.J., Welsh, J.M., and Kwok, S.C. (1985). Structure and evolution of the insulin gene. *Annu Rev Genet* 19, 463-484.

Stevens, R.B., Ansite, J.D., Mills, C.D., Lokeh, A., Rossini, T.J., Saxena, M., Brown, R.R., and Sutherland, D.E. (1996). Nitric oxide mediates early dysfunction of rat and mouse islets after transplantation. *Transplantation* 61, 1740-1749.

Stewart, P.L., Chiu, C.Y., Huang, S., Muir, T., Zhao, Y., Chait, B., Mathias, P., and Nemerow, G.R. (1997). Cryo-EM visualization of an exposed RGD epitope on adenovirus that escapes antibody neutralization. *EMBO J* 16, 1189-1198.

Stoffers, D.A. (2004). The development of beta-cell mass: recent progress and potential role of GLP-1. *Horm Metab Res* 36, 811-821.

Sun, F.L., Dean, W.L., Kelsey, G., Allen, N.D., and Reik, W. (1997). Transactivation of Igf2 in a mouse model of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 389, 809-815.

Sun, J.B., Holmgren, J., and Czerkinsky, C. (1994). Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10795-10799.

Suomalainen, M., Nakano, M.Y., Keller, S., Boucke, K., Stidwill, R.P., and Greber, U.F. (1999). Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J Cell Biol* 144, 657-672.

Surwit, R.S., and Schneider, M.S. (1993). Role of stress in the etiology and treatment of diabetes mellitus. *Psychosom Med* 55, 380-393.

Suzuki, A., Nakauchi, H., and Taniguchi, H. (2004). Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes* 53, 2143-2152.

Swenne, I. (1982). The role of glucose in the in vitro regulation of cell cycle kinetics and proliferation of fetal pancreatic B-cells. *Diabetes* 31, 754-760.

## T

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

Teta, M., Long, S.Y., Wartschow, L.M., Rankin, M.M., and Kushner, J.A. (2005). Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes* 54, 2557-2567.

Teuscher, A.U., Kendall, D.M., Smets, Y.F., Leone, J.P., Sutherland, D.E., and Robertson, R.P. (1998). Successful islet autotransplantation in humans: functional insulin secretory reserve as an estimate of surviving islet cell mass. *Diabetes* 47, 324-330.

Thomas, F.T., Contreras, J.L., Bilbao, G., Ricordi, C., Curiel, D., and Thomas, J.M. (1999). Anoikis, extracellular matrix, and apoptosis factors in isolated cell transplantation. *Surgery* 126, 299-304.

Thomas, H.E., Irawaty, W., Darwiche, R., Brodnicki, T.C., Santamaria, P., Allison, J., and Kay, T.W. (2004). IL-1 receptor deficiency slows progression to diabetes in the NOD mouse. *Diabetes* 53, 113-121.

Thomas, H.E., and Kay, T.W. (2000). Beta cell destruction in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes Metab Res Rev* 16, 251-261.

Thorel, F., Népote, V., Avril, I., Kohno, K., Desgraz, R., Chera, S., and Herrera, P.L. (2010). Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* 464, 1149-1154.

Tian, J., Lei, P., Laychock, S.G., and Andreadis, S.T. (2008). Regulated insulin delivery from human epidermal cells reverses hyperglycemia. *Mol Ther* 16, 1146-1153.

Todd, J.A., Walker, N.M., Cooper, J.D., Smyth, D.J., Downes, K., Plagnol, V., Bailey, R., Nejentsev, S., Field, S.F., Payne, F., et al. (2007). Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* 39, 857-864.

Tollefson, A.E., Scaria, A., Hermiston, T.W., Ryerse, J.S., Wold, L.J., and Wold, W.S. (1996). 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.

Topp, B.G., McArthur, M.D., and Finegood, D.T. (2004). Metabolic adaptations to chronic glucose infusion in rats. *Diabetologia* 47, 1602-1610.

Torres-Aleman, I. (2010). Toward a comprehensive neurobiology of IGF-I. *Dev Neurobiol* 70, 384-396.

Tran, P.O., Parker, S.M., LeRoy, E., Franklin, C.C., Kavanagh, T.J., Zhang, T., Zhou, H., Vliet, P., Oseid, E., Harmon, J.S., et al. (2004). Adenoviral overexpression of the glutamylcysteine ligase catalytic subunit protects pancreatic islets against oxidative stress. *J Biol Chem* 279, 53988-53993.

Tsang, Y.T., Neelamegham, S., Hu, Y., Berg, E.L., Burns, A.R., Smith, C.W., and Simon, S.I. (1997). Synergy between L-selectin signaling and chemotactic activation during neutrophil adhesion and transmigration. *J Immunol* 159, 4566-4577.

Tuttle, R.L., Gill, N.S., Pugh, W., Lee, J.P., Koeberlein, B., Furth, E.E., Polonsky, K.S., Naji, A., and Birnbaum, M.J. (2001). Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha. *Nat Med* 7, 1133-1137.

Téllez, N., Joanny, G., Escoriza, J., Vilaseca, M., and Montanya, E. (2011). Gastrin treatment stimulates  $\beta$ -cell regeneration and improves glucose tolerance in 95% pancreatectomized rats. *Endocrinology* 152, 2580-2588.

Téllez, N., Montolio, M., Biarnés, M., Castaño, E., Soler, J., and Montanya, E. (2005). Adenoviral overexpression of interleukin-1 receptor antagonist protein increases beta-cell replication in rat pancreatic islets. *Gene Ther* 12, 120-128.

Téllez, N., Montolio, M., Estil-les, E., Escoriza, J., Soler, J., and Montanya, E. (2007). Adenoviral overproduction of interleukin-1 receptor antagonist increases beta cell replication and mass in syngeneically transplanted islets, and improves metabolic outcome. *Diabetologia* 50, 602-611.

## U

Uhles, S., Moede, T., Leibiger, B., Berggren, P.O., and Leibiger, I.B. (2003). Isoform-specific insulin receptor signaling involves different plasma membrane domains. *J Cell Biol* 163, 1327-1337.

## V

Valenzano, K.J., Heath-Monnig, E., Tollefsen, S.E., Lake, M., and Lobel, P. (1997). Biophysical and biological properties of naturally occurring high molecular weight insulin-like growth factor II variants. *J Biol Chem* 272, 4804-4813.

van Haeften, T., and Twickler, T. (2004). Insulin-like growth factors and pancreas beta cells. *Eur J Clin Invest* 34, 249-255.

Van Schravendijk, C.F., Foriers, A., Van den Brande, J.L., and Pipeleers, D.G. (1987). Evidence for the presence of type I insulin-like growth factor receptors on rat pancreatic A and B cells. *Endocrinology* 121, 1784-1788.

Vantyghem, M.C., Kerr-Conte, J., Arnalsteen, L., Sergent, G., Defrance, F., Gmyr, V., Declerck, N., Raverdy, V., Vandewalle, B., Pigny, P., et al. (2009). Primary graft function, metabolic control, and graft survival after islet transplantation. *Diabetes Care* 32, 1473-1478.

Vargas, F., Vives-Pi, M., Somoza, N., Armengol, P., Alcalde, L., Martí, M., Costa, M., Serradell, L., Dominguez, O., Fernández-Llamazares, J., et al. (1998). Endotoxin contamination may be responsible for the unexplained failure of human pancreatic islet transplantation. *Transplantation* 65, 722-727.

Vasavada, R., Gonzalez-Pertusa, J., Fujinaka, Y., Fiaschi-Taesch, N., Cozar-Castellano, I., and Garcia-Ocaña, A. (2006). Growth factors and beta cell replication. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 931-950.

Verma, I.M., and Weitzman, M.D. (2005). Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* 74, 711-738.

Virtanen, S.M., Hyppönen, E., Läärä, E., Vähäsalo, P., Kulmala, P., Savola, K., Räsänen, L., Aro, A., Knip, M., and Akerblom, H.K. (1998). Cow's milk consumption, disease-associated autoantibodies and type 1 diabetes mellitus: a follow-up study in siblings of diabetic children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabet Med* 15, 730-738.

Volpers, C., and Kochanek, S. (2004). Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med* 6 Suppl 1, S164-171.

von Herrath, M.G., Efrat, S., Oldstone, M.B., and Horwitz, M.S. (1997). Expression of adenoviral E3 transgenes in beta cells prevents autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9808-9813.

## W

Wajapeyee, N., Serra, R.W., Zhu, X., Mahalingam, M., and Green, M.R. (2008). Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* 132, 363-374.

Wang, P.H. (2001). Roads to survival: insulin-like growth factor-1 signaling pathways in cardiac muscle. *Circ Res* 88, 552-554.

Wang, R.N., Klöppel, G., and Bouwens, L. (1995). Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia* 38, 1405-1411.

Warnock, G.L., Kneteman, N.M., Ryan, E.A., Rabinovitch, A., and Rajotte, R.V. (1992). Long-term follow-up after transplantation of insulin-producing pancreatic islets into patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 35, 89-95.

Weber, M., Deng, S., Kucher, T., Shaked, A., Ketchum, R.J., and Brayman, K.L. (1997). Adenoviral transfection of isolated pancreatic islets: a study of programmed cell death (apoptosis) and islet function. *J Surg Res* 69, 23-32.

Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H., and Rothman, J.E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759-772.

Welsh, N. (1996). Interleukin-1 beta-induced ceramide and diacylglycerol generation may lead to activation of the c-Jun NH2-terminal kinase and the transcription factor ATF2 in the insulin-producing cell line RINm5F. *J Biol Chem* 271, 8307-8312.

Welsh, N., Oberg, C., Hellerström, C., and Welsh, M. (1990). Liposome mediated in vitro transfection of pancreatic islet cells. *Biomed Biochim Acta* 49, 1157-1164.

White, S.A., Nicholson, M.L., and Hering, B.J. (2000). Can islet cell transplantation treat diabetes? *BMJ* 321, 651-652.

Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresch, D.A., and Nemerow, G.R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73, 309-319.

Wiethoff, C.M., Wodrich, H., Gerace, L., and Nemerow, G.R. (2005). Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J Virol* 79, 1992-2000.

Withers, D., Burks, D., Towery, H., Altamuro, S., Flint, C., and White, M. (1999). Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet* 23, 32-40.

Wold, W.S., and Gooding, L.R. (1991). Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interactions. *Virology* 184, 1-8.

## X

Xu, G., Kaneto, H., Lopez-Avalos, M.D., Weir, G.C., and Bonner-Weir, S. (2006). GLP-1/exendin-4 facilitates beta-cell neogenesis in rat and human pancreatic ducts. *Diabetes Res Clin Pract* 73, 107-110.

Xu, G., Stoffers, D.A., Habener, J.F., and Bonner-Weir, S. (1999). 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.

Xu, J., Lu, Y., Ding, F., Zhan, X., Zhu, M., and Wang, Z. (2007). Reversal of diabetes in mice by intrahepatic injection of bone-derived GFP-murine mesenchymal stem cells infected with the recombinant retrovirus-carrying human insulin gene. *World J Surg* 31, 1872-1882.

Xu, X., D'Hoker, J., Stangé, G., Bonn , S., De Leu, N., Xiao, X., Van de Casteele, M., Mellitzer, G., Ling, Z., Pipeleers, D., et al. (2008). Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* 132, 197-207.

## Y

Yan, X., Payet, L.D., Baxter, R.C., and Firth, S.M. (2009). Activity of human pregnancy insulin-like growth factor binding protein-3: determination by reconstituting recombinant complexes. *Endocrinology* 150, 4968-4976.

Yang, Y., Nunes, F.A., Berencsi, K., Furth, E.E., G ncz l, E., and Wilson, J.M. (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4407-4411.

Yang, Y.W., and Kotin, R.M. (2000). Glucose-responsive gene delivery in pancreatic Islet cells via recombinant adeno-associated viral vectors. *Pharm Res* 17, 1056-1061.

Yatoh, S., Dodge, R., Akashi, T., Omer, A., Sharma, A., Weir, G.C., and Bonner-Weir, S. (2007). Differentiation of affinity-purified human pancreatic duct cells to beta-cells. *Diabetes* 56, 1802-1809.

Yechoor, V., and Chan, L. (2005). Gene therapy progress and prospects: gene therapy for diabetes mellitus. *Gene Ther* 12, 101-107.

Yeung, W.C., Rawlinson, W.D., and Craig, M.E. (2011). Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ* 342, d35.

## Z

Zapf, J., Futo, E., Peter, M., and Froesch, E.R. (1992). Can "big" insulin-like growth factor II in serum of tumor patients account for the development of extrapancreatic tumor hypoglycemia? *J Clin Invest* 90, 2574-2584.

Zeggini, E., Weedon, M., Lindgren, C., Frayling, T., Elliott, K., Lango, H., Timpson, N., Perry, J., Rayner, N., Freathy, R., et al. (2007). Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science* 316, 1336-1341.

Zhang, B., and Roth, R.A. (1992). The insulin receptor-related receptor. Tissue expression, ligand binding specificity, and signaling capabilities. *J Biol Chem* 267, 18320-18328.

Zhang, Q., Tally, M., Larsson, O., Kennedy, R.T., Huang, L., Hall, K., and Berggren, P.O. (1997). Insulin-like growth factor II signaling through the insulin-like growth factor II/mannose-6-phosphate receptor promotes exocytosis in insulin-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6232-6237.

Zhang, Y., and Bergelson, J.M. (2005). Adenovirus receptors. *J Virol* 79, 12125-12131.

Zhang, Y., Yao, L., Shen, K., Xu, M., Zhou, P., Yang, W., Liu, X., and Qin, X. (2008). Genetically engineered K cells provide sufficient insulin to correct hyperglycemia in a nude murine model. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40, 149-157.

Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., and Melton, D.A. (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455, 627-632.

Zhou, Q., Law, A.C., Rajagopal, J., Anderson, W.J., Gray, P.A., and Melton, D.A. (2007). A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis. *Dev Cell* 13, 103-114.

Ziegler, A.G., Hillebrand, B., Rabl, W., Mayrhofer, M., Hummel, M., Mollenhauer, U., Vordemann, J., Lenz, A., and Standl, E. (1993). On the appearance of islet associated autoimmunity in offspring of diabetic mothers: a prospective study from birth. *Diabetologia* 36, 402-408.

Zimmet, P., Alberti, K.G., and Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-787.

Zumsteg, U., Frigerio, S., and Holländer, G.A. (2000). Nitric oxide production and Fas surface expression mediate two independent pathways of cytokine-induced murine beta-cell damage. *Diabetes* 49, 39-47.



**PRODUCCIÓ CIENTÍFICA  
DERIVADA D'AQUEST TREBALL**



**Publicacions**

**Elisabet Estil·les**, Noèlia Téllez, Joan Soler, Eduard Montanya. High sensitivity of  $\beta$ -cell replication to the inhibitory effects of interleukin-1beta. Modulation by adenoviral overexpression of insulin-like growth factor-II in rat islets. *Journal of Endocrinology* 203, 55-63 (2009). (Factor d'impacte 2009: 2.860).

**Elisabet Estil·les**, Noèlia Téllez, Jessica Escoriza, Eduard Montanya. Increased beta cell replication, and beta cell mass regeneration in syngeneically transplanted rat islets overexpressing insulin-like growth factor-II. *Cell Transplantation* 21, 2119-2129, 2012. (Factor d'impacte 2012: 4.422).

**Comunicacions a congressos:**

**Elisabet Estil·les**, Noèlia Téllez, Marta Montolio, Sílvia Rodríguez-Mulero, Joan Soler, Eduard Montanya. La sobreexpressió del gen insulin-like growth factor II (IGF-II) modula els efectes d'interleucina-1beta sobre la replicació i l'apoptosi de les cèl·lules beta pancreàtiques. 8è congrés de l'Associació Catalana de Diabetis (ACD). Terrassa, març-abril 2005. Comunicació oral.

**Elisabet Estil·les**, Noèlia Téllez, Marta Montolio, Sílvia Rodríguez-Mulero, Joan Soler, Eduard Montanya. Adenoviral overexpression of insulin-like growth factor II modulates beta-cell replication and beta-cell apoptosis in rat pancreatic islet exposed to interleukin-1beta. 41st Annual Meeting of the European Association for the study of Diabetes (EASD). Atenes, Grècia, setembre 2005. Póster. *DIABETOLOGIA* Volume: 48 Supplement: 1 Pages: A154-A154 Meeting Abstract: 414 Published: SEP 2005.

**Elisabet Estil·les**, Noèlia Tellez, Marta Montolio, Joan Soler, Eduard Montanya. Insulin-like growth factor II (IGF-II) mantiene y aumenta la supervivencia de las células beta expuestas a interleucina-1beta (IL-1beta). 18è congrés de la Sociedad Española de Diabetes (SED) Madrid, abril 2006. Comunicació oral.

**Elisabet Estil·les**, Noèlia Tellez, Marta Montolio, Sílvia Rodríguez-Mulero, Joan Soler, Eduard Montanya. Adenoviral overexpression of insulin-like growth factor-II increases beta cell

replication and mass in transplanted islets. 42nd Annual Meeting of the European Association for the study of Diabetes (EASD). Copenhagen, Dinamarca, setembre 2006. Póster. DIABETOLOGIA Volume: 49 Supplement: 1 Pages: 270-271 Meeting Abstract 0442 Published: SEP 2006.



