

UNIVERSITAT DE BARCELONA

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA
MOLECULAR**

**MECANISMES DE LESIÓ DE LA CÈL·LULA BETA
EN EL TRASPLANTAMENT SINGÈNIC D'ILLOTS
DE LANGERHANS**

**Montse Biarnés i Costa
2002**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE BIOQUÍMICA
BIENNI 1996-98

Memòria presentada per la llicenciada MONTSE BIARNÉS I COSTA per optar al grau de Doctor en Bioquímica.

Aquesta Tesi Doctoral ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Eduard Montanya i Mias en el Servei d'Endocrinologia del Hospital Universitari de Bellvitge i Laboratori de Diabetes i Endocrinologia Experimental del Departament de Medicina del Campus de Bellvitge.

Montse Biarnés

Eduard Montanya

Desembre 2002

AGRAÏMENTS

M'agradaria donar les gràcies a tota la gent que durant aquests anys m'han donat un cop de mà i que em disculpin si no els anomeno a tots.

Al Dr. Joan Soler i Ramon, Cap del Servei d'Endocrinologia i Nutrició de l'Hospital de Bellvitge, per donar-me l'oportunitat d'incorporar-me al Laboratori de Diabetes i Endocrinologia Experimental.

Al Dr. Eduard Montanya i Mias, Director del Laboratori de Diabetes i Endocrinologia Experimental de l'Hospital de Bellvitge, per l'ajuda i consells donats al llarg d'aquests anys que m'han permès millorar tant a nivell científic com personal.

A la Mercè, el Victor i la Olga per tot el que em van ensenyar durant els anys que vam compartir al laboratori, per totes les anècdotes i bons moments que van passar junts.

A les nenes del laboratori Marta, Noèlia i Jéssica per la seva paciència amb mi sobretot darrerament i per la seva ajuda. Només dir que sense elles no ho hauria pogut fer. No només les considero companyes de feina sino amigues. Va dedicada!!!

A l'Àlex, el Ferran i la Sandra per l'escàner... i altres coses. Només recordar-los que tenim pendent el CD2 Endocrí-Infecçioses, serà un gran èxit.

A tota la gent de la planta quarta i cinquena que m'han ajudat en tot moment deixant de fer la seva feina per donar-me un cop de mà, especialment al Laboratori de Nefrologia, Neumologia, Cirurgia, Anatomia Patològica, Bioquímica i Biologia Cel·lular.

A la Pilar, el Diego, l'Alvaro, la Natacha, la Antonia i el Pedro de l'estabulari per com m'ha facilitat la feina amb els animals d'experimentació i sobretot pel seu bon humor en tot moment.

A tots els amics de la facultat la Cris, la Begonya, el Xavi, l'Ana, el Txetxu, la Merche, la Rosa, el Txema, el David i la Marta per tots els bons moments que hem passat i que passarem.

A l'Esther, la Mireia, la Nuria i la Mari Luz per totes les bones estones que hem compartit.

Als meus pares, a ma germana, al Luis i al més petit de tots, l'Albert (i al seu germanet) per aguantar-me i estar sempre quan els he necessitat.

ABREVIATURES

AGEs	Productes finals de reaccions de glicosilació
AGLs	Àcids grassos lliures
Akt	Proteïna quinasa B
AMPc	Adenosín monofosfat cíclic
APCs	Cèl·lula presentadora d'antigen
ATP	Adenosín trifosfat
BrdU	5-bromo-2-deoxiuridina
cDNA	Àcid desoxiribonucleic còpia
DAB	3,3-diaminobenzimida tetrahydroclorur
DM-1/2	Diabetis Mellitus tipus 1 i 2
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DNAasa	Desoxiribonucleasa
dNTP	Deoxinucleòtid trifosfat
EDTA	Etilendiaminotetraacètic
FasL	Lligand del receptor Fas
GAD	Àcid glutàmic descarboxilasa
GLP-1	Pèptid I similar a glucagó
GLUT	Transportador de glucosa
GTP	Guanosín trifosfat
HLAs	Antígens de leucòcits humans
HGF	Factor de creixement de l'hepatòcit
IFN γ	Interferó gamma
IGF	Factor de creixement similar a la insulina
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-1R1/2	Receptor de la IL-1 1 i 2
IL-1ra	Antagonista del receptor de la IL-1
IL-1RAcP	Proteïna accessòria al receptor de la IL-1
iNOS	Òxid nítric sintasa induïble

IP	Iodur de propidi
IRAK	Proteïna associada al receptor de la IL-1
IRS	Substrat del receptor de la insulina
K_M	Constant de Michaelis-Menten
MAPK	Proteïna quinasa activada per mitògens
MHC	Molècula del complex major d'histocompatibilitat
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
NAD^+	Nicotinamida-adenina-dinucleòtid oxidat
$NF\kappa B$	Factor nuclear kappa B
NKT	Transportador d'ions orgànics específic de còrtex renal
NO	Òxid nítric
NOD	Ratolí diabètic no obès
^{32}P	Fósfor 32
PAP	Peroxidasa
PBS	Tampó fosfat salí
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PDK1	Proteïna quinasa dependent de PI3K
PDX-1	Pancreatic duodenum homeobox-1
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinasa
PKC	Proteïna quinasa C
PNF	'No funció primària'
PS	Fosfatidilserina
RIPE3b1	Activador de l'element 3b1 del promotor de la insulina
RNA	Àcid ribonucleic
RNAasa	Ribonucleasa
RT	Reacció de la transcriptasa reversa
SAPK	Proteïna quinasa activada per estrès
SDS	Dodecilsulfat sòdic
STZ	Estreptozotocina
TAE	Tampó Tris-acetat-EDTA
TGF β	Factor de creixement transformant beta

TNF α	Factor de necrosi tumoral alfa
TNFR	Receptor del factor de necrosi tumoral
TUNEL	‘Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling’
ZDF	Rata Zucker diabètica obesa
X \pm SEM	Mitjana \pm Error Estàndard de la Mitjana

ÍNDEX

Agraïments

Abreviatures

Índex

INTRODUCCIÓ	1
1. Illots de Langerhans	3
1.1. Embriogènesi.....	3
1.2. Estructura	5
Vascularització	7
1.4. Funció.....	8
1.4.1. Gen de la insulina	8
1.4.2. Estructura de la insulina.....	9
1.4.3. Biosíntesi i secreció de la insulina.....	10
1.4.4. Vies de transducció del senyal induïdes per la insulina	12
2. Massa cel·lular beta	15
2.1. Regulació de la massa cel·lular beta	15
2.2. Augment de la massa cel·lular beta.....	16
2.2.1. Neogènesi	16
2.2.2. Replicació i hipertròfia	17
2.2.2.1. Cicle cel·lular beta.....	18
2.2.2.2. Gens i factors de creixement implicats en replicació	19
2.3. Reducció de la massa cel·lular beta.....	20
2.4. Evolució de la massa cel·lular beta al llarg de la vida	20
2.5. Canvis adaptatius de la massa cel·lular beta	22
3. Mort cel·lular	24
3.1. Mecanismes de mort cel·lular	24
3.2. Apoptosi	24
3.2.1. Característiques morfològiques del procés d'apoptosi	25

3.2.2. Elements implicats en el procés d'apoptosi.....	26
3.2.3. Factors inductors del procés d'apoptosi	28
3.2.4. Vies de transducció del senyal de mort	30
3.3. Necrosi	32
3.3.1. Característiques morfològiques i bioquímiques	32
3.3.2. Factors inductors del procés de necrosi	34
3.4. Mètodes de detecció de la mort cel·lular per apoptosi i necrosi	34
3.5. Mort cel·lular beta	36
3.5.1. Necrosi i cèl·lula beta	37
3.5.2. Apoptosi i cèl·lula beta	38
3.5.3. Efectes deleteris dels nivells elevats de glucosa.....	39
3.5.3.1. Mecanismes de glucotoxicitat	40
3.5.4. Efectes deleteris dels nivells elevats d'àcids grassos	43
3.5.4.1. Mecanismes de toxicitat dels àcids grassos.....	44
4. IL-1 β i òxid nítric	45
4.1. Citocines.....	45
4.1.1. Caracterització i classificació de les citocines.....	45
4.1.2. Citocines pro-inflamatòries	45
4.1.3. Citocines i trasplantament.....	46
4.1.4. IL-1 β	47
4.1.4.1. Gen IL-1 β	47
4.1.4.2. Proteïna IL-1 β	48
4.1.4.3. Vies de transducció del senyal induïdes per la IL-1 β	49
4.1.4.4. IL-1 β i cèl·lula β	51
4.2. Òxid nítric	54
4.2.1. Òxid nítric sintases	55
4.2.2. Òxid nítric i cèl·lula beta	55
5. Diabetis Mellitus: etiopatogènia i trasplantament d'illots de Langerhans.....	59
5.1. Etiopatogènia de la Diabetis Mellitus tipus 1.....	59
5.1.1. Destrucció de les cèl·lules beta en la DM-1	59

5.2.	Etiopatogènia de la Diabetis Mellitus tipus 2.....	63
5.3.	Trasplantament d'illots de Langerhans	64
5.3.1.	Trasplantament de pàncrees versus trasplantament d'illots	64
5.3.2.	Trasplantament en humans: estat actual del trasplantament.....	65
5.3.3.	Massa beta i trasplantament.....	67
OBJECTIUS	73
MATERIAL I MÈTODES	77
6.	Animals d'experimentació.....	79
6.1.	Inducció de la Diabetis.....	79
6.2.	Tractament amb insulina	79
7.	Aïllament d'illots pancreàtics	80
8.	Grups experimentals	81
9.	Trasplantament d'illots pancreàtics	83
10.	Extracció dels empelts en els diferents grups experimentals.....	84
11.	Mesura del pes i la glicèmia.....	85
12.	Determinació dels nivells d'àcids grassos lliures en plasma	85
13.	Immunohistoquímica	85
13.1.	Quantificació de la mort de les cèl·lules beta.....	85
13.1.1.	Quantificació de la mort de cèl·lules beta per apoptosi.....	86
13.1.1.1.	Tinció per la tècnica del TUNEL	86
13.1.1.2.	Tinció per iodur de propidi.....	88
13.1.2.	Quantificació de l'àrea insular necròtica.....	88
13.2.	Quantificació de la replicació de cèl·lules beta.....	89
13.2.1.	Tinció per BrdU.....	89
13.3.	Quantificació de l'àrea individual de les cèl·lules beta.....	90

13.4.	Quantificació de la massa de les cèl·lules beta.....	91
14.	Anàlisi de RNA per RT-PCR.....	91
14.1.	Extracció de RNA total	91
14.2.	Protocol d'amplificació per RT-PCR	92
14.3.	Mètode semiquantitatiu	93
14.4.	Encebadors	93
14.5.	Protocol d'hibridació	94
14.6.	Densitometria	95
15.	Anàlisi estadística	95
	RESULTATS	97
16.	Evolució metabòlica dels animals d'experimentació	99
16.1.	Evolució del pes	99
16.2.	Evolució de la glicèmia	101
17.	Nivells d'àcids grassos lliures en plasma	103
18.	Morfologia dels empelts	104
19.	Mort de les cèl·lules beta	106
19.1.	Apoptosi de les cèl·lules beta pel TUNEL	106
19.2.	Apoptosi de les cèl·lules beta per iodur de propidi	107
19.3.	Àrea insular necròtica.....	108
20.	Replicació de les cèl·lules beta	110
21.	Àrea individual de la cèl·lula beta.....	111
22.	Massa de les cèl·lules beta	112
23.	Mediadors citotòxics en illots pancreàtics trasplantats.....	114
23.1.	Model d'hiperglicèmia i normoglicèmia en rata.....	114
23.2.	Evolució metabòlica dels animals d'experimentació.....	116

23.2.1. Evolució del pes	116
23.2.2. Evolució de la glicèmia	117
23.3. Mort de les cèl·lules beta.....	118
23.4. Expressió de la interleucina-1 β i l'òxid nítric sintasa	119
23.4.1. Expressió d'un gen específic de ronyó (NKT).....	119
23.4.2. Expressió del gen de la interleucina-1 beta (IL- β).....	121
23.4.3. Expressió del gen de l'òxid nítric sintasa induïble (iNOS).....	124
DISCUSSIÓ	127
CONCLUSIONS	147
BIBLIOGRAFIA	151

Publicació

INTRODUCCIÓ

1. Illots de Langerhans

Els illots de Langerhans són petites agrupacions de cèl·lules, molt vascularitzades, distribuïdes per tota la porció exocrina del pàncrees que sintetitzen i secreten diferents hormones. La més rellevant de les hormones secretades és la insulina, encarregada de regular la captació i la metabolització de la glucosa per part de la cèl·lula. Per tant un dèficit relatiu o absolut d'insulina o una alteració en l'acció de la insulina produeix una utilització defectuosa de la glucosa als teixits i, en conseqüència, una hiperglicèmia. Aquesta disfunció o pèrdua de les cèl·lules productores d'insulina condueix a la diabetis mellitus.

1.1. Embriogènesi

El pàncrees es forma a partir de la formació d'una protuberància dorsal i una ventral a l'epiteli de la part duodenal de l'intestí primitiu. El brot ventral forma la part inferior del cap del pàncrees, mentre que la resta de l'òrgan s'origina a partir del brot dorsal. A l'embrió del ratolí comencen a ser evidents els brots primerencs pancreàtics en el dia 9 (e9). A partir del dia 10 (e10) l'epiteli pancreàtic prolifera i envaeix el mesènquima del voltant i interaccions epiteliomesenquimals condueixen a la proliferació, ramificació i diferenciació de l'epiteli a cèl·lules endocrines i exocrines (367,118).

Basant-se en dades moleculars recents s'ha proposat un model pel paper de diferents factors de transcripció en la diferenciació de les cèl·lules pancreàtiques (Fig.1.). En el dia 8 (e8) un factor de transcripció desconegut dirigirà una regió del endoderm cap a la formació del pàncrees, inhibint l'expressió d'unes molècules de la família hedgehog. Just abans de l'evaginació de l'epiteli pancreàtic per formar els brots pancreàtics en el període e8.5 s'indueix l'expressió del factor de transcripció pancreàtic duodenum homeobox-1 (PDX-1/IPF-1). L'expressió del factor de transcripció Nkx2.2 s'inicia al voltant del dia e8.75-e9 tant a l'epiteli pancreàtic dorsal com ventral i finalment expressa a totes les cèl·lules de l'illot excepte a les productores de somatostatina. En el dia 9 (e9) s'ha

observat l'expressió de PDX-1 en la part ventral i dorsal de l'epiteli (3,244). El patró d'expressió de PDX-1 i la seva capacitat d'estimular la transcripció del gen de la insulina suggereix que funciona tant en la regionalització de l'endoderm de l'intestí primitiu com en la maduració de les cèl·lules beta pancreàtiques (3,244). Les mutacions en homozigosi del gen PDX-1 a humans i ratolins dona lloc a una completa agènesi del pàncrees (152,243,329). S'ha descrit que un membre de la família de gens de la neurogenina, *ngn3*, s'expressa durant el desenvolupament del pàncrees i que la seva absència provoca la manca de cèl·lules endocrines, indicant que promou la seva formació (121). Les primeres cèl·lules endocrines a aparèixer són les cèl·lules glucagó al voltant del e9.5 i requereixen els factors de transcripció *Isl1* i *Pax-6*. Normalment no expressen PDX-1 suggerint que les cèl·lules glucagó s'originen a partir d'un grup de diferent de cèl·lules progenitores PDX-1 negatives. Es mantenen uns nivells alts d'expressió de PDX-1 fins e10.5, posteriorment l'expressió es redueix i una gran majoria de les cèl·lules epitelials inicien l'expressió del factor de transcripció p48. Aquestes cèl·lules p48 positives són les cèl·lules progenitores del llinatge exocrí. Les cèl·lules insulina i somatostatina semblen segregar-se relativament tard en el desenvolupament i la seva diferenciació requereix l'expressió del factor de transcripció *Pax-4*. Les cèl·lules insulina apareixen al voltant del e14.5 i depenen de l'expressió de PDX-1, *Nkx6.1* i *Hb9*, mentre que les cèl·lules somatostatina apareixen uns dies després a partir de les cèl·lules romanents *Pax-4*. Finalment la diferenciació final de totes les cèl·lules endocrines sembla que depèn de *Isl1* (83).

A etapes primerenques existeix un estadi de cèl·lules protodiferenciades, que proliferen i comencen a diferenciar-se distribuint-se en acúmuls donant lloc a les primeres cèl·lules endocrines. Aquests grups cel·lulars envoltats per membrana basal són envaïts per capil·lars sanguinis i representen els primers illots de Langerhans. Aquesta evolució implica un origen comú de les cèl·lules exocrines i endocrines.

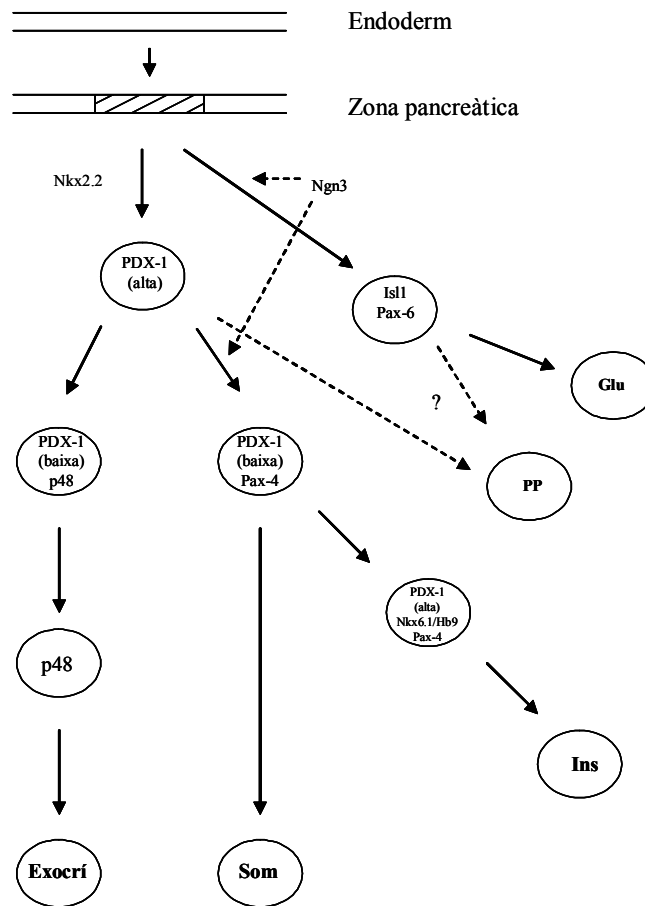


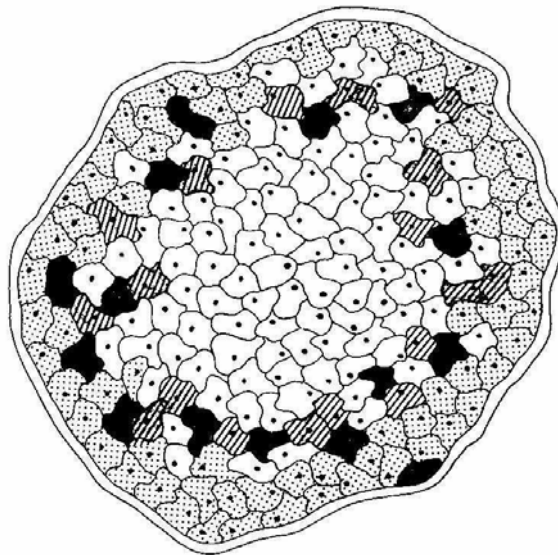
Fig.1. Model de la diferenciació de les cèl·lules pancreàtiques basat en anàlisis genètiques de factors de transcripció. Modificat de Edlund H., et al., 1998.

1.2. Estructura

Tant en els éssers humans com en els animals d'experimentació s'ha observat l'existència de diferents tipus cel·lulars amb una distribució particular i en diferents proporcions dins l'illot (109) (Fig.2.):

1. Cèl·lules B o β : secreten insulina. Són el tipus cel·lular més nombrós (60%) i ocupen principalment la part central de l'illot a rosegadors. A humans aquesta distribució no està tant clara, ja que les cèl·lules no beta també es troben ocupant el centre de l'illot.

2. Cèl·lules A o α : secreten glucagó. Constitueixen el 25% de la població cel·lular de l'illot i es distribueixen per la perifèria de l'illot o envoltant els capil·lars que el travessen.
3. Cèl·lules D o δ : secreten somatostatina i representen un 10% de les cèl·lules insulars, però en el nouvat són 20 vegades més nombroses que a l'adult. Es distribueixen per la perifèria de l'illot i a prop dels capil·lars com les cèl·lules A.
4. Cèl·lules PP: secreten polipèptid pancreàtic. Ocupen un 5% de la massa cel·lular i es situen al voltant dels capil·lars i a la perifèria de l'illot, una mica més a l'interior que les cèl·lules A i D.







Cèl·lules α		→	Glucagó
Cèl·lules β		→	Insulina
Cèl·lules γ		→	Somatostatina
Cèl·lules PP		→	Polipèptid pancreàtic

Fig.2. Distribució de les diferents cèl·lules de l'illot de Langerhans.

1.3. Vascularització

Els illots pancreàtics reben del 5-15% del flux sanguini que arriba al pàncrees, malgrat que constitueixen només el 1% de tot el pàncrees (222,181,225,149). Els illots es troben altament vascularitzats degut a la presència de diferents arterioles (1-5) aferents que entren a l'illot a través de la capa de cèl·lules A, D i PP que es divideixen en nombrosos capil·lars (235,39,190). El flux sanguini es dona a través d'aquesta xarxa de capil·lars sinusoïdals que recorden morfològicament un glomèrul renal, sent de vital importància ja que permeten l'arribada de nutrients i oxigen a les cèl·lules endocrines i de senyals reguladors nutricionals, hormonals i neurohormonals a través de l'endoteli capil·lar i de l'espai intersticial (117, 248).

S'han proposat tres models d'organització del sistema vascular a l'illot: microcirculació polar, microcirculació de la perifèria al centre de l'illot o del centre a la perifèria de l'illot (47). En el model de microcirculació polar, la circulació entra a l'illot a partir del pol aferent, travessa l'illot i surt pel pol eferent i es troba regulada per una sèrie de portes internes i externes. En aquest cas totes les cèl·lules de l'hemisferi del pol aferent són perfoses abans de les del pol eferent tant siguin cèl·lules beta com no beta. En el model en què el flux sanguini es produeix de la perifèria de l'illot cap al centre les cèl·lules no beta són perfoses abans que les cèl·lules beta. Aquest model suggeriria que la somatostatina, el glucagó i el polipèptid pancreàtic exercirien un efecte regulador sobre la secreció d'insulina, mentre que la insulina no tindria efecte dins l'illot sobre les altres cèl·lules al ser les cèl·lules beta les últimes a rebre el flux sanguini a l'illot. En el cas de microcirculació des del centre de l'illot fins a la perifèria aquesta disposició afavoreix l'arribada intrainsular de la insulina produïda per les cèl·lules beta que es troben al centre cap a les cèl·lules A, D i PP de la perifèria. Això permetria que la insulina modulés la secreció de les altres hormones insulars. Alguns vasos recorren només la perifèria i entren en contacte principalment amb les cèl·lules A, D i PP, per desembocar després en les vènules que envolten l'illot. Aquesta sang estaria carregada dels quatre tipus d'hormones, passant així al sistema venós perifèric. Una gran part d'aquests capil·lars abandonen l'illot

i abans de desembocar a les vènules irriguen abundantment la part exocrina del pàncrees, que rebrà així la influència hormonal insular.

L'aïllament dels illots suposarà la pèrdua total o parcial d'aquest sistema vascular original dels illots pancreàtics. Per tant els illots són implantats sense cap connexió vascular al receptor i el restabliment de l'estructura vascular després de l'implantació dels illots serà de vital importància per aconseguir un adequat funcionament i supervivència dels illots trasplantats.

1.4. Funció

La insulina és l'hormona sintetitzada per les cèl·lules beta pancreàtiques, la qual és bàsica per la homeòstasi metabòlica. Degut a la seva rellevància en la diabetis mellitus en el següent apartat ens centrarem en la funció de les cèl·lules beta, principalment en la síntesi i secreció d'insulina.

1.4.1. Gen de la insulina

El gen de la insulina és un gen hipervariable que es troba situat a l'home a la regió p15.5 del cromosoma 11 (248) i que consta de tres exons i de dos introns (326). En el cas dels rosegadors existeixen dos gens que codifiquen per dos molècules de proinsulina, la proinsulina I i II. Els gens proinsulina I i II a rata es troben localitzats en el cromosoma 1 (316), en canvi als ratolins els dos gens estan situats en dos cromosomes diferents, al cromosoma 7 i 19 (70,81). El promotor del gen de la insulina consta d'una sèrie de seqüències com els elements A, E, C1 i Z on s'uniran unes proteïnes d'unió al DNA específiques de seqüència o factors de transcripció (220). El transcrit de RNA té uns 1500 nucleòtids i els nivells de RNA estan modulats per glucosa, AMPc i dexametasona, a més d'altres substrats com altres sucres, nutrients, aminoàcids, citocines i ions que també són capaços de regular l'expressió del gen.

La glucosa regula la transcripció del gen de la insulina actuant sobre diverses proteïnes del complex d'activació de la transcripció (111,219,310,242,297). La glucosa

estimula l'augment de la unió del factor de transcripció PDX-1 als elements A del promotor (197,210,219), en part fosforilant PDX-1 a través de l'acció de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) i la proteïna quinasa activada per estrès 2 (SAPK2) (197,198). A més la glucosa causa la translocació intracel·lular de PDX-1 cap al nucli (197,276) i estimula el domini d'activació de PDX-1 (259). Per altra banda la glucosa augmenta també la unió del dímer de proteïnes de la família hèlix-loop-hèlix bàsic (bHLH) als elements E (112), els quals a la vegada cooperen amb la unió de PDX-1 activat a llocs A per augmentar la transcripció del gen de la insulina. A més a més hi ha altres seqüències importants fora dels elements A-E per la resposta a la glucosa com la unió de proteïnes encara no identificades a llocs C1 i Z (297,385).

De totes maneres, sembla que en circumstàncies fisiològiques la regulació de la síntesi d'insulina per la glucosa es realitza principalment mitjançant un control post-transcripcional del RNA i de la traducció a preproinsulina (48,114,241).

1.4.2. Estructura de la insulina

La insulina està formada per dues cadenes polipeptídiques, anomenades A i B, que en la majoria de vertebrats tenen 21 i 30 aminoàcids, les quals estan connectades per dos ponts disulfur. La composició d'aminoàcids de l'hormona entre les diverses espècies d'animals és força semblant, de forma que per exemple la insulina porcina només es diferencia en un aminoàcid de la humana.

L'activitat biològica es perd totalment pel trencament dels ponts disulfur que uneixen les cadenes A i B, però per altra banda no es perd quan es produeix la substitució d'alguns aminoàcids. Aquest fet s'ha aprofitat en els darrers anys per al disseny d'anàlegs d'insulina utilitzats en el tractament de pacients amb diabetis. Les regions més conservades entre les diferents espècies i que semblen més importants per l'acció biològica són els dos extrems de la cadena A i la part intermèdia de la B. Però el reconeixement del receptor i la funció biològica de la insulina no només depenen de la

composició d'aminoàcids, sinó també de l'estructura tridimensional i, en el cas de la insulina, de la seva tendència espontània a l'autoagregació (44).

1.4.3. Biosíntesi i secreció de la insulina

La insulina es sintetitza a les cèl·lules β de l'illot inicialment com un precursor, la preproinsulina, que immediatament es transforma en proinsulina i que durant el transport intracel·lular previ a la secreció es transformarà en insulina. La preproinsulina es forma en el reticle endoplasmàtic rugós i conté un pèptid senyal comú a totes les prehormones. Quan aquest pèptid senyal es escindit donant lloc a la proinsulina, aquesta es emmagatzemada en microvesícules i es transportada al pol cis de l'aparell de Golgi. Posteriorment en el pol trans es formen els grànuls de secreció dins els quals comença la conversió en insulina (283). Dues convertases, concretament l'endopeptidasa 1 i 2 (284), en un primer pas generen dos polipèptids intermedis anomenats proinsulina Des 64,65 i proinsulina Des 31,32. Finalment en un segon pas de trencament i eliminació de residus generaran el pèptid-C i la insulina (Fig.3.). La insulina que es va produint precipita i forma cristalls amb el zinc present al grànul, ocupant-ne el centre; el pèptid-C, més soluble, resta a la perifèria del grànul, que està separat i protegit de la resta del citosol per una membrana durant el procés de maduració i transport intracel·lular. El grànul de secreció migrarà cap a la membrana plasmàtica seguint el camí marcat per microtúbuls impulsats per microfilaments que contenen proteïnes contràctils activades per l'entrada de calci dins la cèl·lula. El grànul es fusionarà amb la membrana plasmàtica en un procés mitjançat per un grup de proteïnes altament conservades conegudes com proteïnes d'adhesió a NSF soluble (SNAREs), les quals formen part de la maquinària de fusió (146,360). Finalment els productes de secreció són alliberats a l'espai extracel·lular de forma molt finament regulada en resposta a estímuls específics.

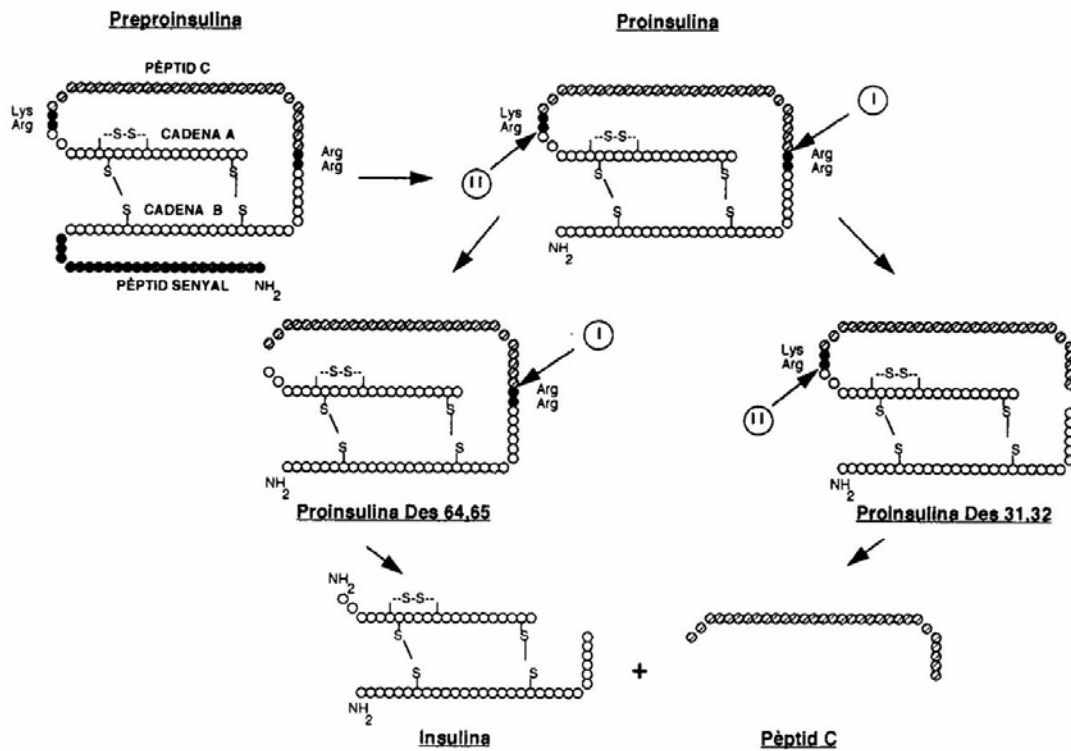


Fig.3. Conversió de preproinsulina a insulina. I i II: corresponen a les endopeptidases 1 i 2. Modificat de Shoelson SE., et al., 1993.

Hi ha diferents factors que regulen la secreció d'insulina, però la glucosa és el de més importància fisiològica (269). In vitro l'estimulació de l'inici de la síntesi d'insulina per la glucosa es produeix a concentracions més baixes de les que es requereixen per estimular la secreció d'insulina (258,362,233), però tant la síntesi com la secreció requereixen la metabolització de la glucosa (19). La cèl·lula β té la capacitat de transportar a través de la membrana plasmàtica grans quantitats de glucosa mitjançant el transportador específic GLUT2 amb una K_M alta (baixa especificitat), fent que en segons les concentracions de glucosa plasmàtiques i citosòliques gairebé s'igualin gràcies a aquesta gran capacitat de transport. Aquest fet iniciarà la glicòlisi oxidativa generant ATP, equivalents oxidats i reduïts i la mobilització de calci, procés que regularà finalment l'exocitosi de la insulina. El ATP generat originarà el tancament dels canals de potassi dependents de ATP, la despolarització de la cèl·lula (20), l'obertura de canals de calci

dependents de voltatge (20,294) i finalment la mobilització dels grànuls d'insulina cap a la membrana plasmàtica pel procés d'exocitosi (171,294,372) (Fig.4.).

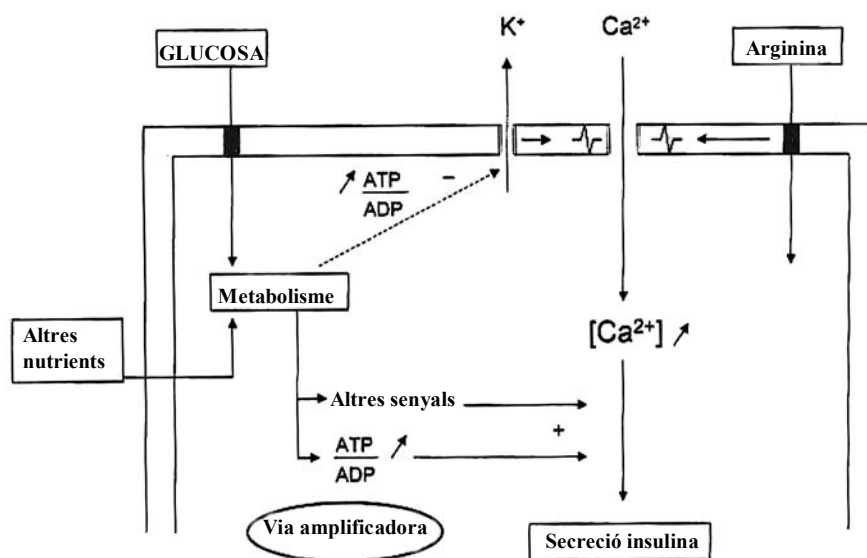


Fig.4. Representació esquemàtica dels mecanismes més importants pels quals la glucosa estimula la secreció d'insulina. Modificat de Henquin JC, 2000.

1.4.4. Vies de transducció del senyal induïdes per la insulina

La insulina és la principal hormona responsable de la senyalització, emmagatzematge i utilització de la glucosa i d'altres nutrients. Els teixits més importants de l'acció de la insulina són el fetge, el múscul i el teixit adipós. La insulina actua com a hormona anabòlica, activant sistemes de transport i enzims relacionats amb la utilització i emmagatzematge de glucosa, aminoàcids i àcids grassos; i com a hormona catabòlica, inhibint la gluconeogènesi, la glucogenòlisi, la lipòlisi i la proteòlisi.

El coneixement de les vies de transducció dels senyals que conduiran a l'activació de les accions fisiològiques induïdes per la insulina encara és incomplet. Les dos principals vies de senyalització de la insulina són la via de les proteïnes quinasa activades per mitògens (MAPK) i la via de la PI-3K. La insulina inicia la seva acció biològica unint-se al seu receptor situat a la membrana cel·lular dels teixits diana. El receptor és un

tetràmer amb dues subunitats A i dues subunitats B unides per ponts disulfur (319). La subunitat A del receptor és extracel·lular i és on té lloc la unió amb la insulina. La subunitat B té una part extracel·lular, una part transmembrana i una part intracel·lular on es troba l'activitat tirosina-quinasa (209). Aquesta activitat enzimàtica s'activa quan la insulina s'uneix a la subunitat A, i a partir d'aquí es posen en marxa una sèrie de fosforilacions en Tyr, Ser i Thr. L'activació de l'activitat tirosina quinasa del receptor d'insulina conduirà a la fosforilació en Tyr d'una sèrie de substrats del receptor de la insulina (IRSs) creant diferents llocs que permetran el reclutament i l'activació de diferents generadors de senyals intracel·lulars independents que inclouen quinases lipídiques com PI-3K i reguladors de GTPases petites com Ras (370).

La via de les MAP quinases s'activa per la unió directa de molècules com Shc al receptor que a la vegada proporciona llocs d'unió per altres substrats com Grb2 i mSOS, els quals conduiran a l'activació de Ras. Finalment una cascada de fosforilacions activarà les MAPK encarregades de promoure els efectes de la insulina sobre el creixement cel·lular. Per altra banda els efectes metabòlics de la insulina són mitjançats per la via de la PI-3K. L'associació de la PI-3K a les molècules IRS condueix a l'activació de la quinasa, que iniciarà una cascada de fosforilacions activant una quinasa dependent de PI-3K (PDK1) i aquesta posteriorment la proteïna quinasa B (Akt). La Akt actuarà sobre altres quinases com p70S6, GSK-3 o PKC per finalment conduir als diferents efectes metabòlics com l'estimulació de la síntesi de glicogen, el transport de glucosa estimulant la translocació del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana o la millora de la síntesi proteica (179). A la vegada la PI-3K podria actuar sobre la MAPK p38 que indueix diferents gens involucrats en el control del creixement cel·lular i l'apoptosi (57,175) (Fig.5.). La insulina a la vegada pot regular diferents processos a l'unir-se a receptors de cèl·lules beta. A través dels membres de la família IRS s'activarien vies de senyalització Tyr quinasa, principalment vies dependents de PI3K. La via activada per PI3K via Akt contribuiria al control del creixement i mida de les cèl·lules beta activant la quinasa p70S6. Per altra banda no està clar com la via de PI3K regularia la síntesi o secreció d'insulina (1).

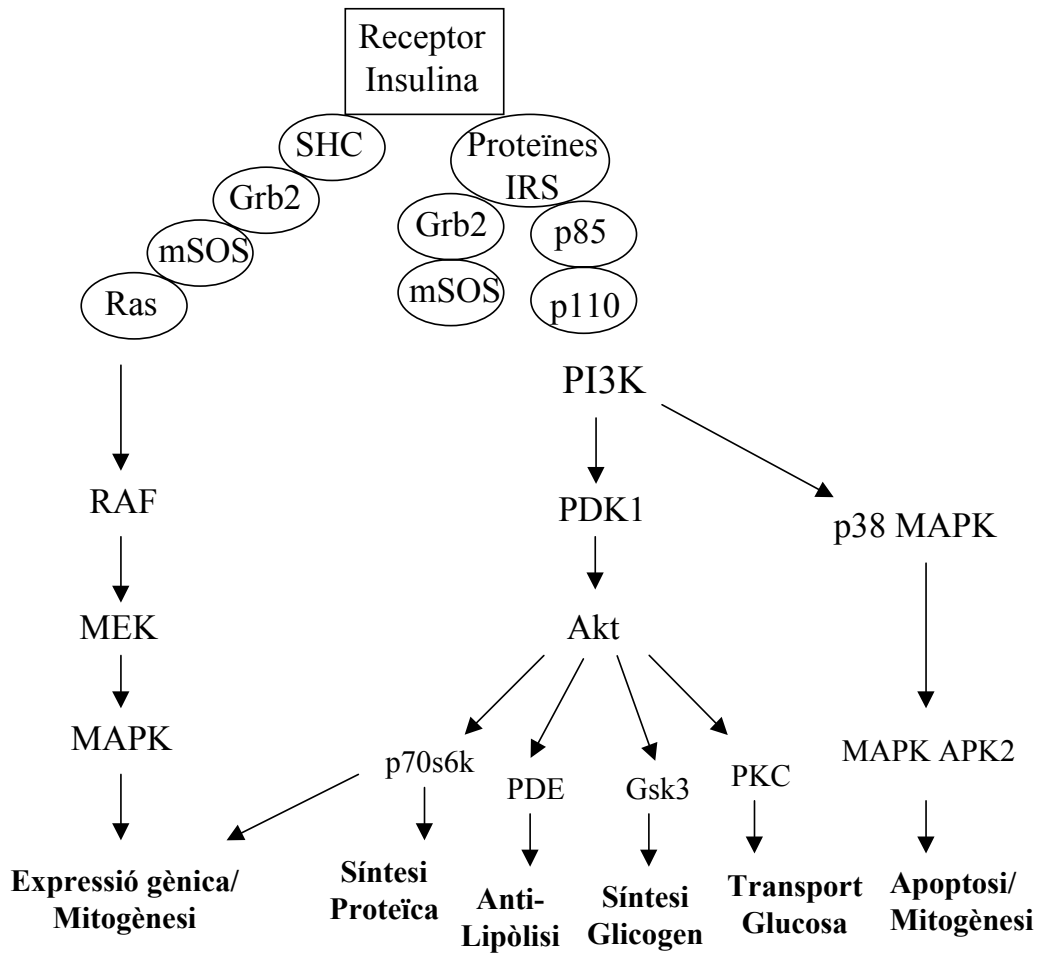


Fig.5. Esquema de les principals vies de transducció de senyal induïdes per la insulina. Modificat de Le Roith D,et al.,2001.

2. Massa cel·lular beta

2.1. Regulació de la massa cel·lular beta

Durant molt temps s'havia considerat que la massa cel·lular beta era fixa i que es naixia amb totes les cèl·lules beta pancreàtiques que es tindrien al llarg de la vida. Però durant les últimes dècades evidències clares han mostrat que la massa beta és dinàmica i que té una gran capacitat d'adaptació als canvis de demanda metabòlica (40). Els canvis en la massa es poden produir tant per nombre (hiperplàsia) com per volum individual de les cèl·lules beta (hipertròfia) (228). El nombre de cèl·lules beta depèn del balanç entre la neogènesi, la replicació i la mort de les cèl·lules beta. Per tant els mecanismes potencials involucrats en la regulació de la massa cel·lular beta són els següents (Fig.6.):

- 1) canvis en l'índex de neogènesi a partir de cèl·lules precursors
- 2) canvis en l'índex de replicació
- 3) canvis en l'índex de mort cel·lular
- 4) canvis en la mida/volum cel·lular

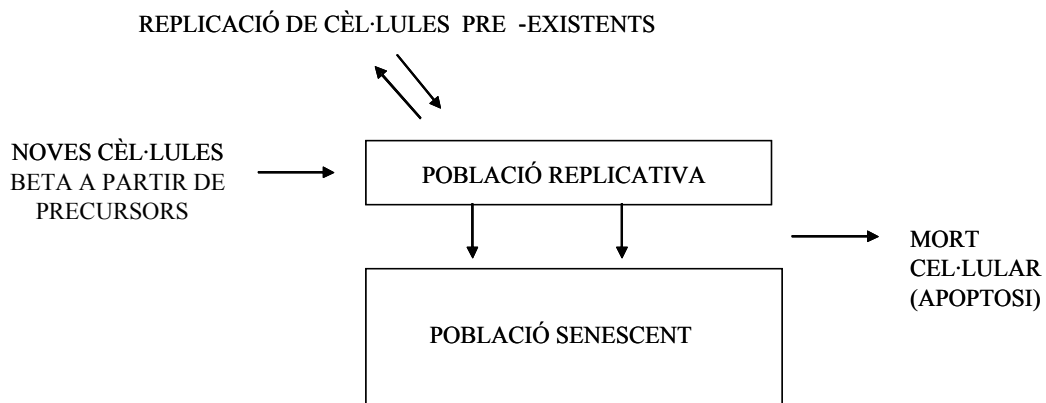


Fig.6. Esquema de l'estat dinàmic de la massa cel·lular beta. Modificat Bonner-Weir S., et al., 2000.

2.2. Augment de la massa cel·lular beta

Els tres mecanismes que condueixen a un augment de la massa beta són la neogènesi o diferenciació a partir de cèl·lules precursors, la replicació d'una cèl·lula beta diferenciada i la hipertròfia de la cèl·lula beta.

2.2.1. Neogènesi

El procés de neogènesi és un dels mecanismes importants en l'expansió de la massa cel·lular beta durant el desenvolupament (102). En canvi en els pàncrees adults la neogènesi dels illots es produeix amb una freqüència baixa. La font més probable de cèl·lules precursors serien els ductes pancreàtics, ja que l'epiteli ductal adult conserva l'habilitat de donar lloc a tots els tipus cel·lulars diferenciats del pàncrees. Els ductes en l'adult normalment es troben quiescents, degut a la presència de factors inhibidors de la seva expansió com components de les matrius o factors solubles com el factor de creixement transformant beta (TGF- β) (34).

La proliferació dels ductes sembla independent de la glucosa, ja que in vivo en el model de pancreatectomia parcial aquest procés es produeix abans de l'increment dels nivells de glucosa en sang (36). S'ha hipotetitzat que cèl·lules ductals madures amb un índex de replicació ràpid poden donar lloc a un fenotip menys diferenciat que pot funcionar com a cèl·lules mare del pàncrees adult (309). Estímuls externs poden conduir a la diferenciació d'aquestes cèl·lules pluripotencials a cèl·lules endocrines, acinars o cèl·lules ductals madures. In vitro ha estat possible l'obtenció d' illots humans a partir del cultiu de teixit ductal humà (38).

La neogènesi contribueix a més a la regeneració de cèl·lules beta després de danys diabetogènics com una pancreatectomia parcial del 90% i l'administració d'una dosi alta d'estreptozotocina. En el model de pancreatectomia parcial del 90% després de 4 setmanes de la cirurgia la massa beta era del 45% i el pes del pàncrees corresponia al 27% del pàncrees dels animals no pancreatectomitzats. S'havia produït un augment de la replicació

de les cèl·lules diferenciades preexistents i una regeneració ràpida tant de teixit endocrí com exocrí, degut a l'expansió del teixit ductal i la posterior diferenciació a noves cèl·lules acinars i insulars (36). Per altra banda en illots de ratolí tractats amb dosis altes d'estreptozotocina s'ha observat la transdiferenciació d'altres tipus cel·lulars endocrins en cèl·lules beta (101). Recentment han aparegut les primeres evidències que demostren que la neogènesi de cèl·lules beta també contribueix a l'expansió de la massa cel·lular beta durant la infusió crònica de glucosa al 50% a partir de la diferenciació de teixit acinar cap a unes estructures petites semblants als ductes i a cèl·lules beta (185).

2.2.2. Replicació i hipertròfia

Experimentalment l'augment de la proliferació i mida de les cèl·lules beta diferenciades s'ha observat en un gran nombre de models com per exemple en rates infoses amb glucosa al 50% durant 96 h i en rates tractades amb exendina-4. En el primer model, la infusió crònica de glucosa en rates comporta un augment del 50% en la massa de cèl·lules beta en només 96 h degut a un augment de 4-5 vegades en la replicació i a la hipertròfia de les cèl·lules beta (35). En el segon model, rates normals van rebre un tractament durant 10 dies amb exendina-4, un agonista d'acció prolongada del pèptid I similar a glucagó (GLP-1). GLP-1 és una hormona intestinal que s'ha descrit que augmenta la secreció d'insulina estimulada per glucosa. Després de 15 dies de finalitzar el tractament es va observar un augment del 40% de la massa beta degut a un augment tant en la proliferació com en la neogènesi (378). S'ha descrit també un augment de la replicació i de la mida de les cèl·lules beta trasplantades en resposta a un canvi en la demanda metabòlica, resultant en un augment de la massa cel·lular beta trasplantada, demostrant-se així la capacitat de les cèl·lules beta trasplantades de respondre a canvis en la demanda metabòlica (229).

2.2.2.1. Cicle cel·lular beta

La durada del cicle cel·lular de les cèl·lules beta de l'illot és de 14.9 h, de les qual 2.5 h corresponen a la fase G₁, 6.4 h a la fase S, 5.5 h a la fase G₂ i 0.5 h a la mitosi (337). La durada és constant independentment de l'edat de l'animal i de si la cèl·lula ha estat estimulada per la glucosa. Per tant, la taxa de creixement de cèl·lules beta no està determinada per canvis en la duració del cicle cel·lular, però sí pel número de cèl·lules beta que passen de la fase de repòs (G₀) a la fase de divisió (G₁). El número de cèl·lules en proliferació varia amb el grau d'estimulació i amb l'edat (336).

L'entrada a la fase G₁ activa diferents sistemes de segons missatgers com un flux d'entrada de Ca²⁺, recanvi de fosfolípids i diferents proteïnes quinasa com les MAPK. L'efecte de totes aquestes cascades és una inducció transitòria, però ràpida dels factors de transcripció c-fos i c-jun a moltes cèl·lules, encarregats de regular l'expressió de diferents gens. A més es produeix una inducció tardana de l'expressió de c-myc. La línia cel·lular βTC-1, derivada d'insulinomes de l'antigen T SV40 transgènic (84), es converteix en quiescent després de tres dies de retirada del sèrum del cultiu (46). Quan es readdiciona sèrum al cultiu s'indueix la transició de la fase G₀ a la G₁ en una gran proporció de cèl·lules. Aquest fet està acompanyat per un increment de l'expressió de c-jun i c-fos, mentre que l'expressió de c-myc i de la quinasa cdc2 quasi no canvia (46). L'expressió baixa i quasi sense canvis de c-myc suggereix que aquest gen necessita altres gens en aquestes cèl·lules productores d'insulina en replicació.

Uns dels elements encarregats del control del cicle cel·lular són les ciclines de tipus D, les quals s'associen a les quinases Cdk 4 i 6. L'activació d'aquestes quinases comporta la regulació negativa del pas de fase G₁ a fase S. S'ha descrit que una mutació en Cdk4 provoca que la quinasa no es pugui unir a un inhibidor del cicle cel·lular conduint a una hiperplàsia del pàncrees en ratolins amb aquesta mutació degut a un augment de la proliferació de les cèl·lules beta. Aquests resultats demostren que la quinasa Cdk4 és essencial pel control de la proliferació de les cèl·lules beta (278).

2.2.2.2. Gens i factors de creixement implicats en replicació

Per entendre els mecanismes reguladors del creixement de la cèl·lula beta s'han estudiat els canvis d'expressió gènica que es produeixen quan les cèl·lules beta són estimulades a replicar-se. Rig és un gen que només s'expressa a cèl·lules d'insulinoma (341) i s'ha descrit que és important en la replicació d'aquestes cèl·lules (141), ja que la inhibició de la producció de la proteïna rig amb oligonucleòtids anti-sentit condueix a la inhibició de la replicació. Més tard a illots de rates pancreatectomitzades tractades amb nicotinamida es va identificar l'expressió del gen reg a les cèl·lules de l'illot que s'estaven replicant durant el procés de regeneració del pàncrees (344). El gen reg codifica per la proteïna pancreàtica stone (PSP), la qual es sintetitzada també a pàncrees exocrí (226) i mostra homologia amb lectines animals que promouen creixement (255) i amb diferents proteases en Ser (116). L'expressió del gen reg a cèl·lules beta correlacionava amb l'índex de replicació d'aquestes cèl·lules (106,226), però la seva funció actualment encara no es coneix amb exactitud.

Per altra banda hi ha una sèrie de factors de creixement que estimulen la replicació de les cèl·lules beta com els IGFs (insulin-like growth factors) i HGFs (hepatocyte growth factors). La producció de grans quantitats de IGF-II durant la vida fetal mitjançant un model de ratolí transgènic per IGF-II provoca un creixement important dels illots pancreàtics, degut a un augment de les tres principals poblacions de cèl·lules endocrines (261). De la mateixa manera la sobreproducció de HGF a l'illot en un model de ratolí transgènic augmenta la proliferació de les cèl·lules beta, el número d'illots, la massa cel·lular beta i la producció total d'insulina in vivo (110).

A més s'ha descrit recentment que el GLP-1 actua com a factor de creixement a cèl·lules de la línia INS-1 (49) i a teixit insular de ratolí (330). A concentracions fisiològiques GLP-1 augmenta la síntesi de DNA a cèl·lules INS-1 mitjançant un mecanisme que implicaria l'activació de PI-3K. A més GLP-1 regula l'expressió del gen de la insulina i d'altres gens implicats en el transport i metabolisme de la glucosa (49).

2.3. Reducció de la massa cel·lular beta

La mort cel·lular beta per apoptosi pot jugar un paper actiu en la regulació de la massa cel·lular beta a pàncrees tant en el període neonatal com en període post-part (302,303). A més la reducció de la massa de cèl·lules beta deguda a una adaptació a una menor demanda metabòlica s'ha descrit en diferents models com en un model de trasplantament d'insulinomes a rata (33) i en un model de trasplantament singènic d'una massa beta en excés (230). En el cas del trasplantament d'insulinomes a rates singèniques la disminució de la massa de cèl·lules beta es degut a un procés d'apoptosi de les cèl·lules beta endògenes. Les hipoglicèmies prolongades que pateixen les rates serien claus en el feedback negatiu que provocaria la inhibició de l'activitat de les cèl·lules beta i la disminució de la massa beta (33). En el trasplantament d'illots pancreàtics a receptors normoglicèmics la massa beta disminueix de forma dràstica en els dies 10 i 30 després del trasplantament, malgrat que la replicació de les cèl·lules beta és normal. Després del trasplantament aquests receptors tenen un excés de cèl·lules beta, amb els illots trasplantats i els seus illots endògens, i la reducció de la massa beta podria ser una resposta protectora davant el risc de hipoglicèmies (230).

2.4. Evolució de la massa cel·lular beta al llarg de la vida

Als anys 60 i 70 en rosegadors i als 80 en humans es van descriure augments en la massa de cèl·lules beta i la mida dels illots al llarg de la vida. A partir de dades de diferents investigadors s'ha descrit un increment lineal de la massa de cèl·lules beta a rates des del deslletament fins als 6 mesos d'edat (102), posteriorment la massa beta continua incrementant-se fins als 20 mesos d'edat (228). A rosegadors la massa de cèl·lules beta incrementa al llarg de la vida amb un estret paral·lelisme amb l'augment de pes corporal suggerint que l'adaptació de la massa cel·lular beta és essencial pel manteniment de la normoglicèmia en condicions fisiològiques (228,34) (Fig.7.).

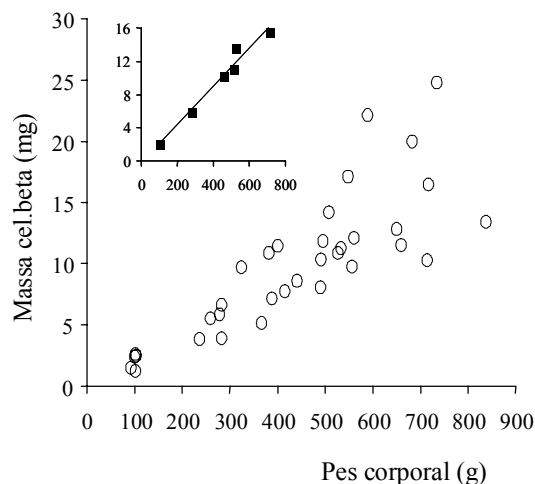


Fig.7. Relació lineal entre la massa beta i el pes corporal de rates Lewis de 1-20 mesos d'edat. Modificat de Montanya E., et al., 2000.

La neogènesi es creu que és el mecanisme principal de formació de cèl·lules beta a l'embrió. Per tant en el període fetal la majoria de les cèl·lules beta es formen per diferenciació a partir de cèl·lules precursors. A la part final de la gestació es produeix un augment de la replicació de les cèl·lules beta i després del naixement la formació de cèl·lules beta es dona principalment a partir de la replicació de cèl·lules beta preexistents, tot i que també s'ha descrit una segona onada de neogènesi durant l'alletament formant-se illots nous.

Durant el període neonatal la replicació de les cèl·lules beta es manté alta (18%), es redueix només després del deslletament i es manté sense canvis després dels 30-40 dies d'edat (102,303). En el pàncrees neonatal de rata també s'ha observat un increment en l'apoptosi. Es va descriure que la massa de cèl·lules beta durant les setmanes 1-3 de vida no augmenta malgrat que la replicació és considerablement més alta que en l'adult. En els primers dies després del naixement (dia 2 i 9) els valors d'apoptosi estan augmentats (1.5%) en comparació amb les rates adultes (0.37%) i aquests valors augmenten encara més en els dies 13 i 17 respecte els dies anteriors (3.5% i 3.08%, respectivament). Aquest augment simultani de l'apoptosi i la replicació descrita anteriorment de les cèl·lules beta

suggereix una remodelació del pàncrees endocrí en aquest període neonatal, possiblement degut a la falta de factors de supervivència com els IGFs (303, 260).

La replicació de les cèl·lules beta és 1-3% en la rata adulta (229), en canvi l'apoptosi és baixa o quasi indetectable (69,78,263,302,303). La mida individual de les cèl·lules beta augmenta des del primer mes de vida fins al setè, però posteriorment es manté relativament estable fins el mes 15 per tornar a augmentar de forma marcada en les rates d'edat (228).

Per tant en els primers mesos de vida tant la hiperplàsia com la hipertròfia contribueixen a un ràpid increment de la massa cel·lular beta, per contra a animals d'edat l'increment de la massa beta està basat en la hipertròfia de les cèl·lules beta.

2.5. Canvis adaptatius de la massa cel·lular beta

Canvis en els processos de replicació, mort i mida cel·lular permetran al teixit insular adaptar la seva massa als canvis de demanda funcional o de concentracions de diferents factors tròfics en determinats moments al llarg de la vida com en l'embaràs o en condicions patològiques. Una situació fisiològica d'augment de la massa de cèl·lules beta degut a una resposta adaptativa puntual és l'embaràs. Durant l'embaràs la massa beta de les rates augmenta un 50% degut a un increment en la proliferació de les cèl·lules beta induïda pel lactogen placentari i per un increment del volum cel·lular (hipertròfia cel·lular) com a mecanisme d'adaptació dels illots davant un augment de la demanda d'insulina (253,254,302). Durant els 10 dies posteriors al part la massa de cèl·lules beta involuciona reduint-se el volum i la proliferació de les cèl·lules beta i augmentant l'apoptosi d'aquestes cèl·lules, possiblement com a resposta al canvi hormonal ràpid que redueix la demanda metabòlica després del naixement (302).

Un exemple d'augment de la massa de cèl·lules beta en condicions patològiques són les rates Zucker diabètiques obesas (ZDF). Hi ha una colònia de rates ZDF en que els

mascles són diabètics al voltant dels 9 mesos d'edat, per contra les femelles no pateixen la malaltia. Això es degut a què les femelles han pogut compensar la demanda d'insulina augmentant la massa de cèl·lules beta i només presenten una lleugera alteració de la tolerància a la glucosa. En comparació amb els animals no-obesos presenten un augment en la replicació i mida de les cèl·lules beta. Per tant la hipertròfia jugaria un paper en la compensació davant de la demanda metabòlica en aquests animals (262).

En resum, la massa cel·lular beta és dinàmica i es troba regulada pel manteniment de la normoglicèmia. El balanç entre els processos de neogènesi, replicació, hipertròfia i mort cel·lular donarà lloc a la massa beta final.

3. Mort cel·lular

3.1. Mecanismes de mort cel·lular

S'han descrit dos vies principals de mort cel·lular: un procés considerat passiu i que condueix a la mort per necrosi i una mort programada, activa, anomenada apoptosi. Però hi ha evidències recents que indiquen que els processos típics de mort per necrosi i apoptosi representen únicament els dos extrems d'un ample rang de possibles processos de mort morfològics i bioquímics (176). Aquests dos tipus clàssics de mort cel·lular poden tenir lloc simultàniament en teixits o en cultius cel·lulars davant el mateix estímul i moltes vegades la intensitat de l'estímul és el que condueix a la mort per necrosi o per apoptosi.

3.2. Apoptosi

Els animals multicel·lulars sovint necessiten eliminar cèl·lules que es troben en excés o que poden ser potencialment perilloses. Per aquest propòsit utilitzen un procés programat actiu anomenat apoptosi o mort cel·lular programada (74). Tant important com la divisió o la migració cel·lular, una mort cel·lular regulada (o programada) permet a l'organisme un control estricte del número de cèl·lules i de la mida d'un teixit.

Després de descobriments i redescobriments per biòlegs i citòlegs, la mort cel·lular programada ha rebut un nombre indeterminat de noms al llarg dels últims dos segles. El terme finalment adoptat va ser el d'apoptosi, donat per Currie i col·laboradors l'any 1972 (164). Es va observar que aquestes cèl·lules que s'estaven morint compartien una sèrie de característiques morfològiques, les quals eren diferents de les cèl·lules que patien una mort cel·lular necròtica o patològica i van suggerir que aquestes característiques morfològiques podien ser el resultat d'un procés de mort cel·lular endogen, conservat i comú.

3.2.1. Característiques morfològiques del procés d'apoptosi

La mort per apoptosi és un procés ràpid que es troba sota control genètic i que requereix energia ja que implica la síntesi *de novo* de proteïnes. El procés està caracteritzat per una sèrie de canvis morfològics que es poden dividir en tres fases (50) (Fig.8.):

- 1) En la primera fase es produeix una condensació de la cromatina cap a la perifèria nuclear, una desintegració del nucleol i una reducció de la mida del nucli. A més també s'observa un encongiment del volum cel·lular total, un augment de la densitat cel·lular, una compactació dels orgànuls citoplasmàtics i una dilatació del reticle endoplasmàtic. Malgrat tots aquests canvis primerencs el mitocondri manté la seva morfologia normal.
- 2) En la segona fase, que es pot solapar amb l'anterior, té lloc l'anomenat 'blebbing' que es caracteritza per una sèrie de deformacions de la membrana. A més es produeix l'exposició de molècules que es troben normalment en l'interior cel·lular com les molècules de fosfatidilserina (PS). Hi ha la formació de cossos apoptòtics a partir de components cel·lulars envoltats de membrana que són fagocitats per part de cèl·lules veïnes o normalment per macròfags, evitant així l'alliberament dels continguts intracel·lulars i per tant evitant la resposta inflamatòria.
- 3) En la tercera fase hi ha una progressiva degeneració de les estructures nuclears i citoplasmàtiques residuals, procés que recorda les característiques de la mort per necrosi i que es coneix com a necrosi secundària.

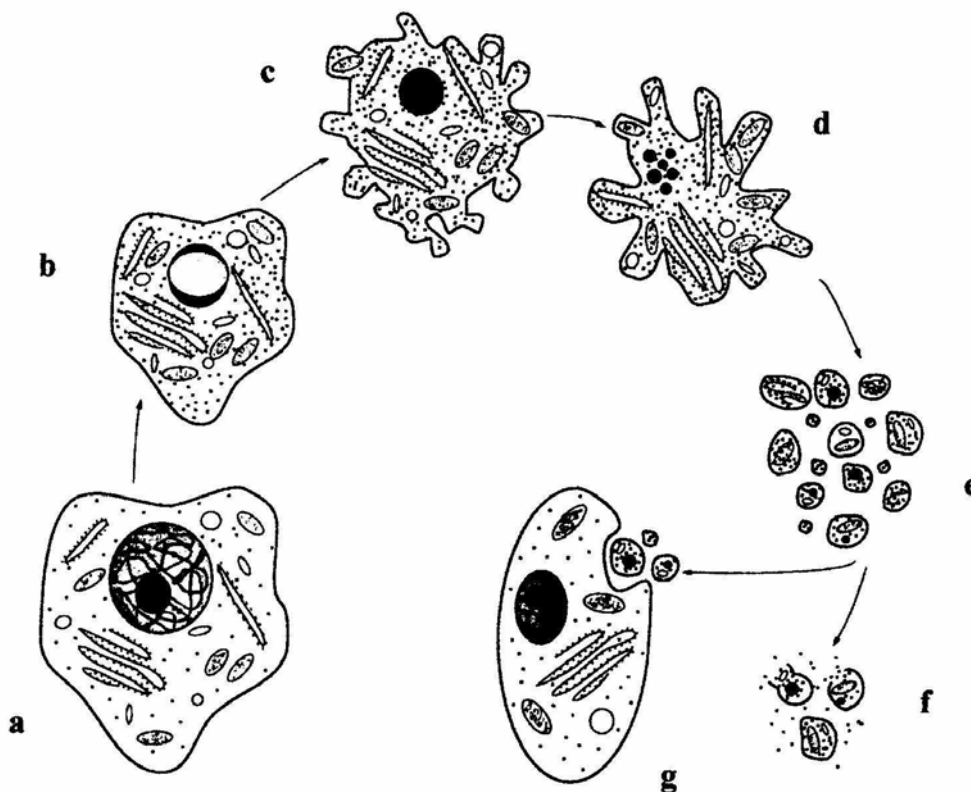


Fig. 8. Esquema del procés de mort cel·lular per apoptosi. a) Cèl·lula viable. b) Fase inicial de l'apoptosi. Es produeix una alteració en el funcionament dels mitocondris i s'inicia el procés de condensació de la cromatina al voltant de la membrana nuclear. c) El citoesquelet es reorganitza, la cromatina i les proteïnes citoplasmàtiques es condensen i la membrana plasmàtica es comença a lobular. d) La membrana nuclear es trenca, el DNA és degradat per endonucleases i la lobulació de la cèl·lula es fa més evident. e) La cèl·lula es divideix en múltiples cossos apoptòtics. f) i g) Els cossos apoptòtics pateixen necrosi secundària i s'acaben lisant o són fagocitats per macrofags o cèl·lules veïnes.

3.2.2. Elements implicats en el procés d'apoptosi

Hi ha un requeriment d'expressió gènica *de novo* per tal que es produeixin tant els canvis morfològics com la mort cel·lular per ella mateixa. Diferents molècules s'han associat al procés d'apoptosi per dos vies diferents: molècules que s'expressen a cèl·lules apoptòtiques i molècules la modulació de les quals afecta el procés de mort. Hi ha dues famílies d'elements que són particularment importants en el control de l'apoptosi:

- 1) la família de proteases conegudes com caspases
- 2) els membres de la família del Bcl-2

1) Caspases

La majoria dels canvis observats en el procés d'apoptosi són causats per unes proteases que tenen en el centre actiu Cys, que tallen substrats específicament en Asp i que s'activen en les cèl·lules apoptòtiques. Aquestes proteases són homòlogues entre si i formen part d'una gran família de proteïnes que s'anomenen caspases (6,240). Les caspases tallen selectivament una sèrie de proteïnes diana, fet que provoca en la majoria dels casos la inactivació de la proteïna, malgrat que també poden activar proteïnes, per exemple eliminant algun domini regulador inhibidor.

L'endonucleasa que talla el DNA durant l'apoptosi es troba en les cèl·lules vives en la seva forma inactiva degut a la presència d'una subunitat inhibidora. Quan la caspasa-3 talla aquesta subunitat provoca l'alliberament i l'activació de la subunitat catalítica i l'enzim comença a realitzar talls al DNA (301). L'acció de l'endonucleasa provoca la formació de fragments múltiples de 180 bp, degut a que l'enzim talla el DNA que uneix els nucleosomes (128). Quan es realitza una electroforesi del DNA, els fragments queden disposats formant una escala i la presència d'aquesta escala de DNA s'ha utilitzat com a marcador de la mort cel·lular apoptòtica. Per altra banda les caspases també tallen laminines nuclears que provoquen l'encongiment nuclear i proteïnes del citoesquelet que condueixen a la pèrdua de la forma cel·lular (128).

Les caspases es troben altament conservades al llarg de l'evolució i a mamífers s'han identificat 14 proteases diferents (66). Existeixen com a zimògens inactius contenint un prodomini i un domini proteasa (66,346). Les caspases que presenten prodominis llargs es creu que són les caspases que actuen més amunt en la cascada de senyalització i s'anomenen caspases iniciadores com la caspasa 1, 8 i 9. Per contra les caspases amb prodominis curts com la caspasa 3, 4 i 6 actuen més avall a la via, es coneixen com caspases efectores, i depenen de les caspases iniciadores per la seva activació. Aquestes proteases es caracteritzen per actuar les unes sobre les altres iniciant així una cascada proteolítica. S'ha considerat que són els executors centrals de la via apoptòtica, ja que el seu bloqueig pot rescatar cèl·lules del seu destí apoptòtic.

2) Proteïnes Bcl-2

La família de les proteïnes Bcl-2 és una important moduladora del procés d'apoptosi. Aquesta família s'ha dividit en tres grups segons un criteri funcional i de similitud estructural. Els membres del grup I com Bcl-2 tenen activitat anti-apoptòtica, mentre que els membres dels grups II, com Bax i Bad, i del grup III, com Bid i Bik, promouen l'apoptosi. Molts membres de la família poden homodimeritzar, però el fet més important és la formació d'heterodímers entre membres pro-apoptòtics i anti-apoptòtics (2,14,282), conduint a la neutralització mútua de les proteïnes unides. La funció clau dels membres de la família Bcl-2 sembla ser la de regular l'alliberament de factors pro-apoptòtics, principalment el citocrom c, del compartiment intermembrana del mitocondri cap al citosol (2,14). Noves evidències han suggerit que la proteïna Bcl-2 pot actuar com a proteïna de canal d'ions i com a proteïna adaptora o pont a través de la seva unió a altres proteïnes. Però la manera precisa en què aquestes proteïnes modulen l'apoptosi no està clara (128).

Finalment, gens involucrats en processos de proliferació i diferenciació cel·lular són també importants en la modulació del procés apoptòtic. El proto-oncogen c-myc (266) i el gen supressor de tumors p53 (312,382) estan implicats en la inducció de l'apoptosi en diferents condicions. Per altra banda el gen supressor A20 és un gen involucrat en la inhibició de l'apoptosi en la resposta primària induïda per les citocines (123).

3.2.3. Factors inductors del procés d'apoptosi

La cascada apoptòtica pot ser activada per una gran varietat d'estímuls, tant factors intracel·lulars com extracel·lulars. Dins els factors intracel·lulars es pot incloure el desequilibri metabòlic, alteracions en el cicle cel·lular i dany en el DNA. Per altra banda dins els factors extracel·lulars trobem l'activació de receptors de mort com els receptors de Fas i TNF, reducció dels factors de creixement, factors metabòlics, algunes hormones i mediadors inflamatoris com les citocines (213) (Fig.9.).

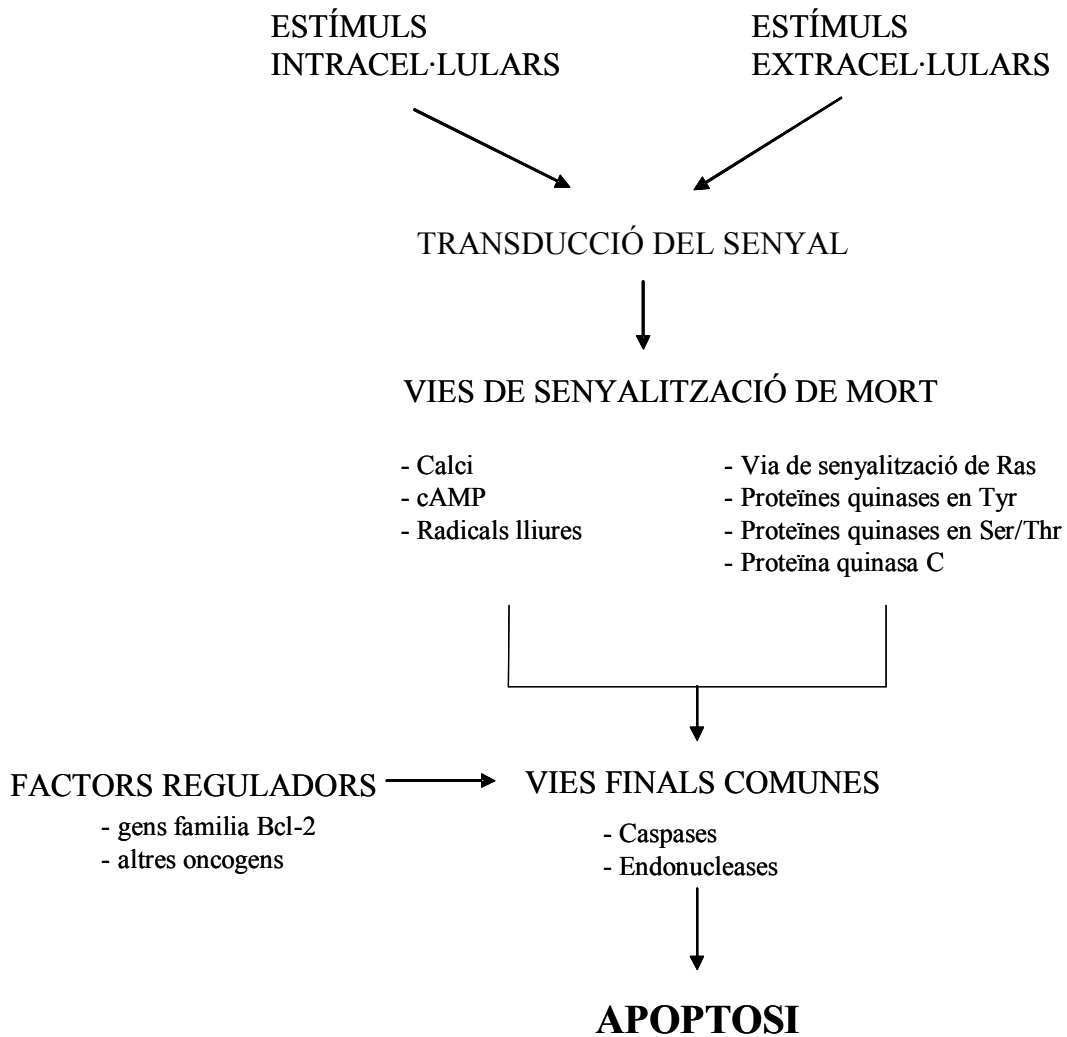


Fig.9. Representació esquemàtica de la cascada apoptòtica. La cèl·lula integra l'informació rebuda per l'entorn intracel·lular i extracel·lular. Diferents senyals de mort poden activar 1 o més vies de transducció de senyal, les quals convergeixen probablement en 1 o més vies finals de mort. Modificat de Mauricio D, et al., 1998.

Els factors inductors de l'apoptosi provoquen danys que es poden classificar en diferents categories en relació al lloc primari d'alteració cel·lular (366):

- 1) la superfície cel·lular: activant receptors de membrana o desregulant el flux a través de la membrana plasmàtica.
- 2) el citosol i compartiments intracel·lulars: factors que alteren la síntesi proteica i els gradients d'ions a través de les membranes intracel·lulars.
- 3) el citoesquelet: alterant l'organització de microtúbuls i les xarxes d'actina.

- 4) el nucli: produint dany en el DNA o alteració de la expressió gènica.
- 5) les vies de senyalització intracel·lular: modificant la fosforilació proteica o la transducció del senyal.

3.2.4. Vies de transducció del senyal de mort

Els senyals intracel·lulars engloben ceramides, augment del contingut de Ca^{+2} intracel·lular, radicals lliures d'oxigen i d'òxid nítric (NO) i proteïnes quinases com les MAPKs, les proteïnes quinases activades per estrès (SAPK) i la proteïna quinasa C. Finalment hi ha unes vies efectores comunes que condueixen a l'activació de les caspases i les endonucleases que tallen el DNA nuclear. Les dues vies apoptòtiques més importants en cèl·lules de mamífer són (135) (Fig 10):

-la via del receptor de mort o extrínseca: induïda per membres de la superfamília dels receptors de mort com el Fas/CD95 o el receptor 1 del factor de necrosi tumoral, TNFR. La unió del lligand de Fas al seu receptor induïx el reclutament d'altres receptors i la formació d'un complex de senyalització inductor de mort. Aquest complex agrupa mitjançant la molècula adaptadora FADD múltiples molècules de procaspasa-8, donant lloc a l'activació de la caspasa-8. L'activació de la caspasa-8 es pot bloquejar via la unió d'un homòleg degenerat de les caspases, c-FLIP (144).

-la via mitocondrial o intrínseca: via que s'activa en resposta a senyals extracel·lulars i a danys interns com dany en el DNA (285). Les diferents respostes davant els estímuls convergeixen en el mitocondri, moltes vegades a través de l'activació d'un membre pro-apoptòtic de la família Bcl-2. Hi ha membres com el Bcl-2 que es troben principalment units a membranes intracel·lulars, però d'altres com Bax, Bad, Bim i Bid poden moure's entre el citosol i els orgànuls (124,180,271,373). Les formes citosòliques estan inactives, però preparades per realitzar la seva funció en qualsevol moment. Els senyals pro-apoptòtics redirigeixen aquestes proteïnes cap el mitocondri, on es pren la decisió sobre el destí de la cèl·lula. L'activació dels membres pro-apoptòtics pot produir-se per proteòlisi i desfosforilació, però és possible que existeixin altres mecanismes implicats (2,14). Els

membres pro- i anti-apoptòtics de la família del Bcl-2 es troben a la superfície del mitocondri, on competeixen per regular la sortida del citocrom c. Si els membres pro-apoptòtics són els predominants diferents molècules són alliberades del compartiment mitocondrial. La principal d'aquestes molècules és el citocrom c, el qual associat amb Apaf-1 i la procaspasa-9 formen el complex anomenat apoptosoma. Aquesta unió activa la caspasa-9, la qual actuarà seqüencialment sobre la caspasa-3 activant-la. La caspasa 3 continuarà el procés proteolític actuant sobre d'altres substrats. A més les proteïnes heat-shock actuen en diferents passos de la via per modular el procés (2,14).

La via del receptor de mort i la mitocondrial convergeixen a nivell de l'activació de la caspasa-3. L'activació de la caspasa-3 està regulada per unes proteïnes inhibidores IAPs, les quals per la seva banda estan regulades negativament per la proteïna Smac/DIABLO que s'allibera del mitocondri. Posteriorment a l'activació de la caspasa-3 la via es diversifica en diferents subprogrames que conduiran al desmantellament i l'eliminació de la cèl·lula. La interacció i la integració de les dues vies es produeix mitjançant Bid, un membre pro-apoptòtic de la família Bcl-2. La proteòlisi de Bid mitjançada per la caspasa-8 augmenta de forma important la seva activitat pro-apoptòtica, comportant la seva translocació cap el mitocondri on promourà la sortida del citocrom c. En la majoria de les condicions el cross-talk és mínim i les dues vies funcionen independentment una de l'altra (124,381). Però possiblement altres vies inductores de mort addicionals deuen existir, ja que ratolins defectius en les vies de la caspasa-8 i -9 pateixen processos d'apoptosi durant el seu desenvolupament (355).

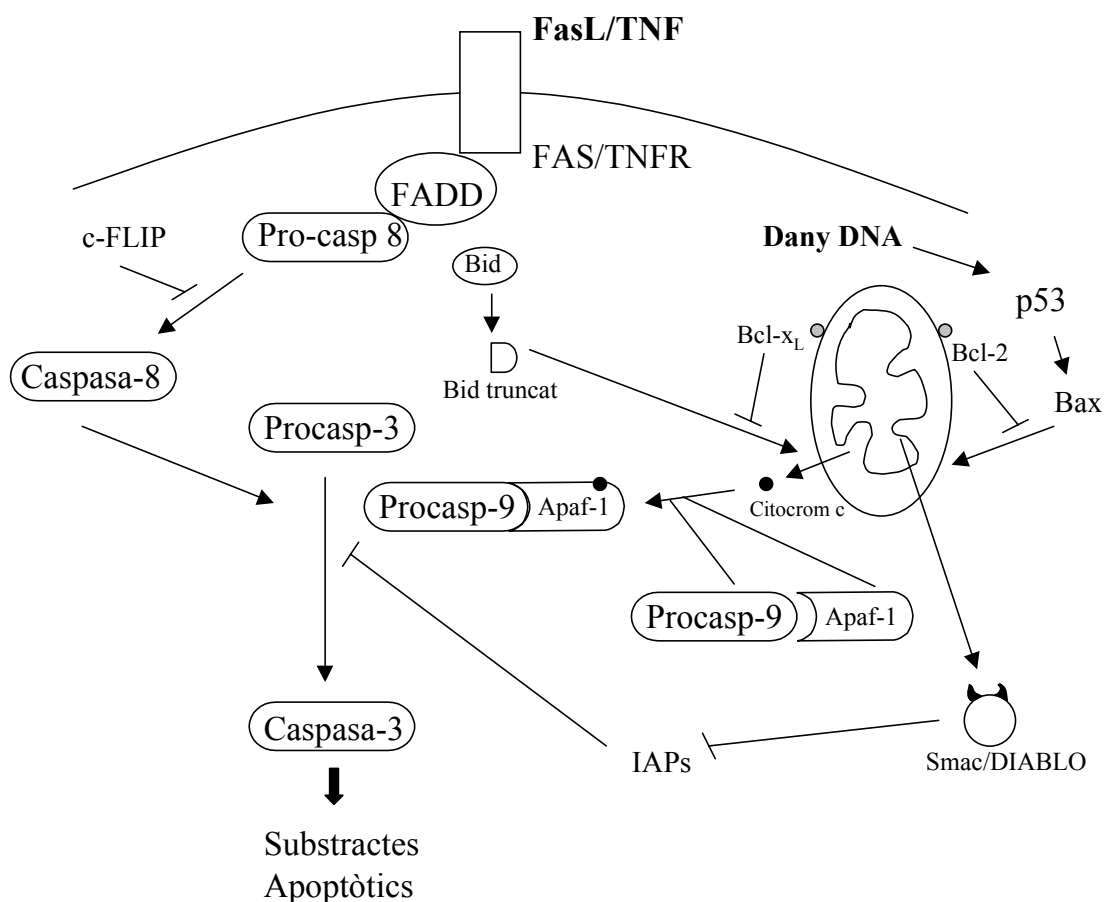


Fig.10. Esquema de les dues principals vies de transducció de senyal de mort a cèl·lules de mamífer. Modificat de Hengartner MO, 2000.

3.3. Necrosi

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

3.3.1. Característiques morfològiques i bioquímiques

La necrosi es caracteritza per canvis irreversibles tant en el nucli com en el citoplasma (50) (Fig.11). Es produeixen canvis primerencs tant en la forma com en la funció mitocondrial, provocant que la cèl·lula sigui incapaç de mantenir l'homeòstasi

cel·lular. S'ha de destacar que els mitocondris s'inflen i apareixen uns dipòsits densos de lipoproteïnes a la matriu mitocondrial, sent aquests els primers canvis ultraestructurals associats a la necrosi. La membrana plasmàtica és el lloc que pateix més danys, perd la seva habilitat de regular la pressió osmòtica, perdent-se el balanç de calci, sodi i aigua. Com a conseqüència la cèl·lula s'infla i finalment es produeix un shock osmòtic (119). L'acidosi o baixada del pH provoca la precipitació de la cromatina, però no es produeix la marginació primerenca de la cromatina cap a la perifèria del nucli ni l'activació de endonucleases, com es dona en el procés d'apoptosi. Finalment el reticle endoplasmàtic i els lisosomes també s'inflen i exploten, alliberant enzims digestius que indueixen la destrucció autolítica de la cèl·lula, la qual acaba trencant-se. Tot el seu contingut intracel·lular es alliberat a l'espai extracel·lular i eliminat pels fagòcits provocant una resposta inflamatòria. Aquesta resposta inflamatòria es necessària per eliminar tot els restes cel·lulars i començar el procés de reparació cel·lular.

Els canvis bioquímics estan associats a l'augment de la permeabilitat del mitocondri i de les membranes plasmàtiques, provocant que alguns components surtin de la cèl·lula i altres materials electrodensos s'acumulin a l'interior. Quan les bombes d'ions presents a la membrana no funcionen davant la disminució de l'energia cel·lular hi ha una aturada del moviment de cations de dins de la cèl·lula cap a l'exterior acompanyat per una entrada de fluids que provoca l'inflament de la cèl·lula. L'augment de concentració de Ca^{2+} activa fosfolipases que metabolitzaran fosfolípids generant lisofosfolípids i àcids grassos, els quals alteraran la integritat de la membrana. L'acumulació de residus granulars a la matriu mitocondrial s'inicia degut a l'excés de calci citosòlic. A l'inici aquestes acumulacions consisteixen únicament en dipòsits de calci inorgànic, però en les últimes etapes de l'evolució de la necrosi contenen a més proteïnes de matriu desnaturalitzades. Seguidament a la pèrdua de la integritat mitocondrial, hi ha una alteració de l'homeòstasi cel·lular i els lisosomes es trenquen alliberant les hidrolases. Aquests potents enzims causen una ràpida desintegració de la cèl·lula (50).

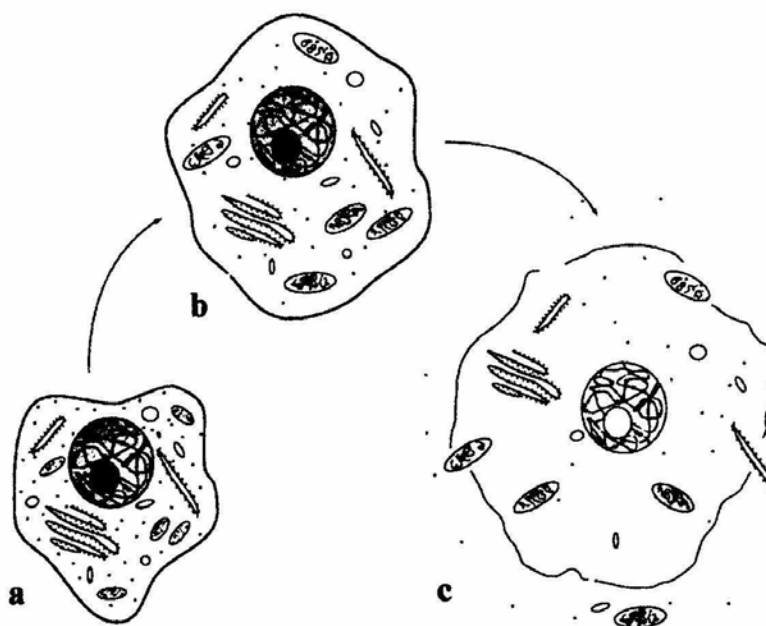


Fig.11. Esquema del procés de mort cel·lular per necrosi. a) Cèl·lula afectada per un factor inductor de necrosi. Els mitocondris perden la capacitat de generar ATP. b) La cèl·lula i els mitocondris s'inflen degut a l'entrada d'aigua al citoplasma. c) La cèl·lula s'acaba lisant i allibera a l'exterior el seu contingut intracel·lular.

3.3.2. Factors inductors del procés de necrosi

El procés de necrosi es desenvolupa a diferents teixits degut a hipòxia severa i isquèmia. També pot produir-se com a conseqüència del dany sobre la membrana cel·lular mitjançat pel sistema del complement, un trauma o l'exposició a diferents toxines. Inhibidors metabòlics com el fluorocitrat o cianida, metabòlits reactius d'oxigen, gran varietat de tòxics químics i inhibidors de bombes d'ions també poden causar necrosi (50).

3.4. Mètodes de detecció de la mort cel·lular per apoptosi i necrosi

Els mètodes de detecció de la mort cel·lular es poden classificar en diferents categories en relació a si es tenen en compte les característiques morfològiques o bioquímiques del procés. No hi ha un sol marcador específic del procés sinó que hi ha un ampli ventall de diferents tècniques que es poden utilitzar.

En relació a la detecció de les característiques morfològiques el mètode ideal és la microscopia electrònica, on els canvis ultraestructurals que tipifiquen tant l'apoptosi com la necrosi poden ser detectats a cèl·lules individuals (66a). Però la quantificació de l'apoptosi requereix altres aproximacions. La anàlisi electroforètica del DNA també anomenada tècnica de l'escala del DNA permet la confirmació de la presència de talls en el DNA, i per tant de cèl·lules apoptòtiques en el total de la població cel·lular estudiada, però no permet quantificar el nombre de cèl·lules apoptòtiques (107). A més detecta únicament un fenomen que es produeix en estadis avançats de l'apoptosi. De totes maneres és una tècnica senzilla de realitzar i es pot utilitzar per verificar resultats obtinguts amb altres tècniques. Per altra banda hi ha molts kits de detecció d'apoptosi basats en la fragmentació del DNA, el més conegut és el mètode de marcatge in situ dels talls en extrems OH 3' del DNA anomenat TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling)(231a). Aquesta tècnica és basa en la detecció dels talls produïts a nivell internucleosomal, ja que el DNA d'aquestes regions està més exposat a l'acció de les endonucleases.

Una tècnica que aprofita els canvis morfològics nuclears i bioquímics a la membrana cel·lular és la citometria de flux (FACS). Una de les metodologies més utilitzades es basa en la combinació de la molècula de iodur de propidi (IP), la qual entra en les cèl·lules necròtiques i tenyeix el nucli, i la proteïna anexina V conjugada amb fluoresceïna, la qual marca residus exposats de fosfatidilserina (PS) cap a l'exterior cel·lular, característica de les primeres fases de l'apoptosi (353). Aquesta tècnica és molt fiable per detectar el percentatge de cèl·lules apoptòtiques i necròtiques. Com hem comentat anteriorment existeixen diferències clares entre les cèl·lules que moren per apoptosi i les que ho fan per necrosi. Es poden realitzar diferents tincions basades en la permeabilitat dels colorants a les membranes de les cèl·lules que s'estan morint. Colorants que s'uneixen al DNA com la tinció amb una barreja de bromur d'etidi i taronja d'acridina o de IP i Hoechst 33342 (138). Concretament en aquesta última tinció el HO 33342 (coloració blava) passa lliurement la membrana plasmàtica i entra tant a cèl·lules amb la membrana intacta com danyada; mentre que el IP (coloració vermella) és impermeable a

les cèl·lules amb la membrana preservada. Per tant les cèl·lules vives queden tenyides de color blau, ja que només pot entrar el HO 342. Per altra banda les cèl·lules apoptòtiques queden tenyides de color blau brillant al no presentar la membrana danyada i tenir la cromatina condensada formant els cossos apoptòtics. Les cèl·lules necròtiques es tenyeixen de rosa degut a què han pogut entrar els dos colorants. Per últim si les cèl·lules presenten una apoptosi tardana amb necrosi secundària es tenyeixen també de color rosa i es poden observar els cossos apoptòtics.

Els processos intracel·lulars que activen l'apoptosi poden ser detectats utilitzant una gran varietat de tècniques de la biologia molecular i cel·lular. La expressió de gens i la conseqüent síntesi proteica poden ser visualitzades mitjançant Northern blot o RT-PCR per el RNA i Western blot per les proteïnes. A més existeixen gran quantitat d'anticossos per la detecció per immunohistoquímica de receptors de mort, citocines, caspases o factors de transcripció implicats en el procés.

3.5. Mort cel·lular beta

Si la mort de les cèl·lules beta en la diabetis insulino-dependent o diabetis mellitus tipus 1 (DM-1) es degut a apoptosi o necrosi o una combinació dels dos processos no ha estat del tot aclarit. Hi ha dues escoles de pensament en relació als mecanismes de destrucció de cèl·lules beta en la DM-1:

- 1) Un model en què les cèl·lules beta són destruïdes per les cèl·lules T citotòxiques mitjançant el sistema de la perforina i els granzims. La perforina causa la lisi de la cèl·lula diana, mentre que els granzims A i B principalment causen apoptosi (186).
- 2) L'altre model hipotetitzava que les cèl·lules T helper específiques d'antígens de la cèl·lula beta són activades a transcriure gens de citocines que indueixen la formació d'un infiltrat de cèl·lules mononuclears específiques i no-específiques i activen cèl·lules endotelials, les quals expressen molècules d'adhesió i secreten mediadors inflamatoris. Els macròfags reclutats són estimulats per l'IFN- γ a produir IL-1 β i TNF- α . Totes tres citocines actuarien sinèrgicament conduint a la lesió de la cèl·lula beta mitjançant la inducció de iNOS a

cèl·lula beta i activant diferents vies inductores d'apoptosi. A més el model també suggereix el paper de la IL-1 β induint l'expressió de Fas a cèl·lula beta, fent les cèl·lules susceptibles a la lisi per cèl·lules T helper1 i citotòxiques que expressin FasL (205,239).

3.5.1. Necrosi i cèl·lula beta

La majoria dels estudis fets sobre la mort específica de cèl·lules beta han utilitzat dues toxines diabetogèniques, l'aloxà i l'estreptozotocina, que causen la destrucció ràpida i específica de les cèl·lules beta de rosegadors. Es va descriure que la glucosa i la nicotinamida podien reduir la toxicitat d'aquestes drogues (205). Experiments posteriors en cèl·lules beta aïllades indicaven que les dues toxines causen una necrosi ràpida i específica de les cèl·lules beta i que la glucosa i la nicotinamida estimulen mecanismes de defensa que poden contrarestar el procés de destrucció (137,264). El mecanisme proposat d'acció d'aquestes drogues és una toxicitat a través de la formació de radicals oxidants i/o a la reducció dels nivells d'ATP. La necrosi de les cèl·lules beta de rata també es produeix quan la fosforilació oxidativa es bloqueja (138). A més les cèl·lules beta són susceptibles a patir necrosi quan s'exposen a radicals oxidants, per exemple en afegir un agent oxidant com el t-butil-hidroperòxid les cèl·lules beta humanes i de rata moren per necrosi, procés que es pot prevenir si són tractades dins de les 24 h posteriors amb nicotinamida (134,264). S'ha proposat que aquestes cèl·lules són particularment sensibles a l'oxidació degut a la baixa activitat dels enzims encarregats d'eliminar els radicals com els enzims manganès superòxid dismutasa mitocondrial i glutatió peroxidasa (204). Aquesta relativa deficiència podria comportar conseqüències negatives únicament quan les cèl·lules mostren uns nivells d'activitat mitocondrial baixos, com per exemple quan els nivells de glucosa són baixos. Aquesta idea estaria d'acord amb les observacions que la susceptibilitat cel·lular al dany oxidatiu varia amb la sensibilitat metabòlica a la glucosa i amb la condició metabòlica. Per tant la cinètica del metabolisme de la glucosa a cèl·lula beta podria protegir les cèl·lules contra el dany oxidatiu (216). Les cèl·lules que tenen alterat el reconeixement de la glucosa serien més vulnerables a les influències oxidatives i a la destrucció.

Durant els últims anys les citocines han estat els agents més importants en l'estudi dels mecanismes de mort de les cèl·lules beta (205,272) i va ser com a conseqüència de l'observació que l'addició de IL-1 β a illots de rata aïllats comportava la pèrdua de funció i dany de les cèl·lules beta que es va iniciar el seu estudi. Es va observar que els efectes tòxics de la IL-1 β eren majors quan els illots eren cultivats a altes concentracions de glucosa i per tant suggerint que hi haurien diferències en la susceptibilitat cel·lular davant d'un dany (205). Aquests efectes tòxics s'atribuïen als nivells alts de NO que es produïen després de l'expressió de l'enzim òxid nítric sintasa induïda (iNOS) per la IL-1 β a cèl·lules beta (60). Concentracions altes de NO causen necrosi a cèl·lules beta humanes i de rata, malgrat que no és un efecte específic ja que pot afectar altres tipus cel·lulars (184).

3.5.2. Apoptosi i cèl·lula beta

Les cèl·lules beta de l'illot també podem morir per apoptosi, com s'ha descrit tant in vitro com in vivo en illots de rata (138,302). Aquest tipus de mort pot ser induïda per una inhibició sostinguda de la síntesi proteica, suggerint que normalment es troba inhibida per proteïnes anti-apoptòtiques que requereixen una adequada síntesi proteica (138). A més in vitro la IL-1 β en combinació amb l'IFN- γ i el TNF- α indueix la mort per apoptosi a cèl·lules de l'illot pancreàtic de rosegadors (205,137,257). Un efecte indirecte de les citocines és l'augment de l'expressió del receptor Fas a cèl·lules beta, incrementant així la susceptibilitat d'aquestes cèl·lules a l'apoptosi mitjançada pel lligand de Fas (FasL), expressat a la superfície de les cèl·lules T i macròfags (8,322,380). Dades recents indiquen que l'expressió de Fas i la mort per apoptosi estan presents a cèl·lules beta humanes a les etapes primerenques de la DM-1 (232,322). En l'apartat 4 i 5 es comenta amb més detalls els mecanismes implicats en la destrucció de les cèl·lules beta per apoptosi.

3.5.3. Efectes deleteris dels nivells elevats de glucosa

La glucosa és el principal substrat estimulador tant de la secreció com de la síntesi d'insulina, però quan la glucosa es manté en uns nivells suprafisiològics durant un determinat període temps es poden produir una sèrie d'efectes deleteris sobre la cèl·lula beta. Diferents evidències han suggerit que l'exposició a nivells elevats de glucosa altera la secreció d'insulina induïda per glucosa i l'expressió gènica de la insulina. Els efectes adversos dels nivells elevats de glucosa sobre la funció de les cèl·lules beta engloben tres fenòmens diferents:

- 1) pèrdua de sensibilitat a la glucosa: és un mecanisme adaptatiu fisiològic davant una exposició curta a elevades concentracions de glucosa fent que hi hagi una inhibició ràpida i reversible de la via d'exocitosi de la cèl·lula beta.

En estudis de perifusió amb una línia de cèl·lules beta pancreàtiques, HIT-T15, davant uns pulsos repetits de glucosa la resposta a la glucosa es perd. Aquesta resposta es recupera de forma lineal i dependent del temps de cultiu de les cèl·lules sense glucosa. Aquests experiments van demostrar que es tractava de pèrdua de sensibilitat a la glucosa i no d'exhauriment cel·lular, perquè al bloquejar la secreció d'insulina amb epinefrina la pèrdua de resposta a la glucosa es produïa igualment (166).

- 2) exhauriment de la cèl·lula beta: es refereix a un esgotament de les reserves d'insulina intracel·lular després d'una exposició prolongada a un secretagog.

En experiments realitzats amb rates pancreatectomitzades en un 90% es va observar després de 2-3 setmanes de la cirurgia que les respostes d'insulina a 16.7 mM glucosa havien caigut un 75%. Però quan al mateix temps es donava un inhibidor de la secreció d'insulina, diazòxid, es bloquejava parcialment la caiguda de la secreció d'insulina induïda per glucosa, indicant que l'excessiva secreció d'insulina era la causa de la pèrdua de la resposta a la glucosa induïda per la hiperglicèmia (173).

- 3) glucotoxicitat: tots els anteriors efectes descrits sobre cèl·lula beta són reversibles, però quan l'exposició a nivells elevats de glucosa és prolongada es tornen irreversibles. El concepte de glucotoxicitat descriu aquests efectes irreversibles induïts per la hiperglicèmia crònica tant sobre la funció com la mort de les cèl·lules beta.

3.5.3.1. Mecanismes de glucotoxicitat

- Glucotoxicitat i funció beta

S'ha suggerit que un dels mecanismes en què els nivells elevats de glucosa poden afectar negativament la funció de les cèl·lules beta pancreàtiques seria disminuint l'índex de transcripció del gen de la insulina. Aquesta hipòtesi està basada en l'observació que l'exposició crònica de la línia de cèl·lules beta HIT-T15 a concentracions suprafisiològiques de glucosa (11.1 mM) disminueix de forma important els nivells de mRNA d'insulina (245). L'alteració de l'expressió del gen de la insulina després d'una exposició mantinguda de nivells elevats de glucosa s'ha associat a una disminució de l'activitat d'unió de dos dels principals factors de transcripció de la cèl·lula beta: PDX-1 i l'activador de l'element 3b1 del promotor de la insulina (RIPE3b1). S'ha demostrat que a cèl·lules HIT-T15 l'exposició a concentracions suprafisiològiques de glucosa condueix a una disminució de l'expressió del factor de transcripció PDX-1 alterant el processament post-transcripcional del RNA de PDX-1 (246). Per altra banda en una altra línia de cèl·lules beta β TC-6 s'ha observat també que l'exposició a concentracions elevades de glucosa comporta una disminució de la transcripció del gen de la insulina que en part es deguda a una disminució de l'activitat d'unió del factor RIPE3b1 (265). A més també s'ha descrit l'augment de l'expressió d'un repressor transcripcional del gen de la insulina, C/EBP β , en les línies de cèl·lules beta derivades d'insulinoma HIT-T15 i INS-1 després de l'exposició a altes concentracions de glucosa (194). Aquesta inducció de C/EBP β podria contribuir a l'alteració de l'expressió del gen de la insulina i de la secreció d'insulina.

S'ha relacionat l'efecte tòxic de la glucosa sobre la funció de la cèl·lula beta amb els canvis en constituents claus de l'expressió del gen de la insulina, però no se n'ha

demonstrat el mecanisme d'acció. S'ha proposat que la glucotoxicitat englobi un procés de estrès oxidatiu crònic. La glucosa pot generar espècies reactives d'oxigen, les quals poden tenir un efecte advers sobre la funció de l'illot. En cèl·lules HIT-T15 s'ha demostrat que es produeix una disminució dels nivells de mRNA d'insulina davant l'exposició curta a D-ribose. D-ribose és un sucre amb una important capacitat reductora que condueix a la producció d'espècies reactives d'oxigen. L'addició de l'antioxidant, N-acetil-L-cisteïna (NAC), va poder evitar l'efecte sobre el gen de la insulina (212). Posteriorment s'ha comprovat que quan aquesta mateixa línia cel·lular es cultiva a 11.1 mM de glucosa de forma crònica també es produeix una disminució de la transcripció del gen de la insulina, evitant-se parcialment l'efecte afegint un antioxidant al medi de cultiu (342). La glucosa és també un sucre reductor, però no té una capacitat reductora tant gran com la ribosa o la fructosa. Per altra banda l'exposició crònica d'illots aïllats a nivells elevats de glucosa in vitro condueix a l'acumulació de productes finals de reaccions de glicosilació (AGEs), a l'alteració de la funció de les cèl·lules beta i a apoptosi, però el tractament amb antioxidants evita tots aquests efectes (155,340). Totes aquestes dades donen força a la hipòtesi que la glucotoxicitat és deguda, al menys en part, a l'estrès oxidatiu crònic.

Recentment s'ha demostrat que l'exposició prolongada a hiperglicèmia in vivo després d'una pancreatectomia del 85-95 % condueix a l'alteració de l'expressió de factors de transcripció claus de l'illot i d'altres gens importants per la secreció d'insulina estimulada per glucosa, suggerint una progressiva pèrdua de la diferenciació de la cèl·lula beta en hiperglicèmia. Per altra banda es va detectar un augment de l'expressió del factor de transcripció c-myc, el qual és un potent estimulador del creixement cel·lular. Aquest augment dels nivells d'expressió de c-myc proposen un nexa d'unió entre l'estimulació del creixement cel·lular i la pèrdua de diferenciació de la cèl·lula beta en animals hiperglicèmics (151).

- Glucotoxicitat i apoptosi cel·lular beta

L'exposició a nivells elevats de glucosa causa defectes en la funció de les cèl·lules beta com hem descrit anteriorment, però pot també induir la mort cel·lular per apoptosi.

Les evidències que relacionen la hiperglicèmia i l'apoptosi provenen d'estudis en models animals. *Psammomys obesus* és un model de diabetis tipus 2 (DM-2) caracteritzat pel desenvolupament de diabetis degut al canvi de dieta al passar del seu habitat natural a la captivitat. Aquesta rata del desert s'alimenta principalment d'una dieta baixa en energia, però al passar a una dieta rica en energia presenta una propensió a desenvolupar una síndrome semblant a la DM-2 associada a una moderada obesitat. S'ha descrit que els animals que han rebut una dieta rica en calories desenvolupen hiperglicèmia al cap de 4 dies i que aquest fet està associat a una reducció progressiva del contingut pancreàtic d'insulina. A més està acompanyat per un increment transitori de la replicació de les cèl·lules beta i un prolongat increment en la taxa de mort de cèl·lules beta, que culminarà en una disrupció de l'organització de l'illot. La hipòtesi de glucotoxicitat que es despenia d'aquestes observacions *in vivo* va ser corroborada per una sèrie d'estudis *in vitro*. Illots de *P.obesus* en cultiu exposats a concentracions elevades de glucosa de forma prolongada presentaven un increment en la fragmentació del DNA de les cèl·lules beta que era resultat d'una mort per apoptosi induïda per glucosa (78). En rates ZDF s'ha observat que la massa cel·lular beta no és capaç d'expandir-se suficientment per compensar la resistència a la insulina probablement degut a què l'exposició a la persistent hiperglicèmia provoca un augment de la mort cel·lular beta per apoptosi que supera la formació de noves cèl·lules beta (263).

Per altra banda també hi ha diferents estudis *in vitro* que demostren que l'exposició d'illots humans a elevades concentracions de glucosa induïx la mort de les cèl·lules beta per apoptosi (99,202). Els illots humans cultivats a 16.7 mM de glucosa durant 5 dies presentaven un augment en l'apoptosi en comparació als illots cultivats a 5.5 mM. L'apoptosi es troba modulada pels gens de la família Bcl-2 i es va postular que les concentracions elevades de glucosa podien afectar la supervivència dels illots humans en cultiu modulant el balanç de les proteïnes pro-apoptòtiques i anti-apoptòtiques de la família Bcl-2 (99). Un altre grup va corroborar les dades anteriors en què l'augment de les concentracions de glucosa induïa apoptosi en cèl·lules beta pancreàtiques humanes. En aquest cas van estudiar l'expressió del receptor Fas i van demostrar que les concentracions

elevades de glucosa induïen l'expressió de Fas i l'activació de les caspases-8 i 3. L'expressió del receptor Fas induiria l'apoptosi mitjançant l'interacció amb el lligand de Fas expressat constitutivament per les cèl·lules beta del voltant (201). Recentment, aquest mateix grup ha descrit que en concentracions altes de glucosa s'indueix la producció i secreció de IL-1 β a cèl·lules beta humanes, conduint finalment a l'augment d'expressió del receptor Fas (202).

En resum, aquestes dades indiquen que l'exposició a nivells de glucosa elevats induïx la mort per apoptosi de cèl·lules beta tant a models animals com a illots humans. Però el coneixement dels mecanismes implicats en aquesta activació encara no és complet.

3.5.4. Efectes deleteris dels nivells elevats d'àcids grassos

Els àcids grassos són unes molècules energètiques essencials per la cèl·lula beta en condicions normals, però es converteixen en tòxiques quan es troben en nivells elevats de forma crònica a l'igual que la hiperglicèmia crònica. S'ha suggerit que uns nivells alts d'àcids grassos lliures (AGLs) mantinguts de forma sostinguda contribueixen al desenvolupament de la diabetis tipus 2. AGLs poden influenciar negativament la secreció i l'acció de la insulina, concretament l'exposició de les cèl·lules beta de forma prolongada a AGLs incrementa els nivells basals de secreció d'insulina, però inhibeix la secreció d'insulina induïda per glucosa (215). A més els AGLs inhibeixen l'expressió del gen de la insulina en presència de nivells alts de glucosa (122,145,289) en part via disminuint l'expressió del factor de transcripció PDX-1 (122).

També hi ha evidències que els AGLs poden causar la mort de les cèl·lules beta al menys a illots de rates ZDF. En aquest model de diabetis associat a obesitat l'increment sostingut dels nivells circulants de AGLs és responsable de l'acumulació de triglicèrids a cèl·lules de l'illot i dels nivells elevats d'àcils grassos lliures que són els components citotòxics (174). S'ha observat que els AGLs augmenten la lipogènesi a cèl·lules beta d'illots de rates Zucker prediabètiques obesas, resultant en la formació de ceramides que induïxen l'expressió d'òxid nítric sintasa (NOS) i la mort per apoptosi de cèl·lules beta dependent de NO (313). El tractament de cèl·lules beta de rata Wistar amb AGLs in vitro

també causa la mort de les cèl·lules beta (58), malgrat que els mecanismes implicats semblen ser diferents que els proposats pels illots de les rates Zucker.

3.5.4.1. Mecanismes de toxicitat dels àcids grassos

No es coneix si els efectes dels AGLs són deguts a un augment en l'oxidació dels àcids grassos i com a conseqüència una disminució de la oxidació de la glucosa o degut a una senyal citosòlica generada per l'esterificació dels àcids grassos. Una de les hipòtesis es basa en què un o diversos metabòlits intermediaris generats en l'esterificació dels àcids grassos serien els responsables dels efectes deleteris de l'exposició prolongada a nivells elevats d'àcids grassos, ja que principalment l'exposició a àcids grassos crònicament està associada a alteracions importants en el metabolisme lipídic i a canvis mínims en el metabolisme glucídic (307). La base bioquímica d'aquesta hipòtesi va ser proposada per Prentki i Corkey (267,268). D'acord amb aquest model, la presència simultània de nivells elevats de glucosa i àcids grassos provoca una acumulació citosòlica de citrat, precursor del malonil-CoA, el qual inhibirà l'enzim responsable dels transport dels àcids grassos cap al mitocondri, la carnitina-palmitoil-transferasa-1. La inhibició de forma sostinguda d'aquest enzim resulta en un acumulació citosòlic d'acils CoA de cadena llarga, els quals s'ha proposat que serien els que exercirien els efectes deleteris (267). Aquest model a més proposa que la concentració de glucosa juga un paper crític en els efectes dels àcids grassos. Però no es coneix si l'acumulació dels acils CoA afecta directament la funció de la cèl·lula beta o actuen com a precursors d'altres molècules actives com diacilglicerols o fosfolípids. També es desconeix la natura dels efectors presents més avall en la via de senyalització, malgrat que s'han proposat diferents candidats com la PKC o la proteïna desacopladora 2 (UCP-2) (268).

4. IL-1 β i òxid nítric

4.1. Citocines

Les citocines són molècules peptídiques secretades per les cèl·lules immunes i inflammatòries per controlar la resposta immune local i sistèmica, l'hematopoesi, la inflamació i la resposta immune davant un dany (15,234,369).

4.1.1. Caracterització i classificació de les citocines

Les citocines són sintetitzades i secretades per limfòcits activats, macròfags/monòcits i per altres cèl·lules que no pertanyen al sistema immune com cèl·lules endotelials, fibroblasts i cèl·lules del múscul llis. Existeixen més 20 citocines actives immunològicament i malgrat que la majoria van ser descrites inicialment amb una única funció biològica, moltes són molècules multifuncionals amb diverses accions biològiques i cèl·lules diana. Les funcions més importants de les citocines són funcions locals sobre cèl·lules veïnes (paracrina) o sobre la mateixa cèl·lula que produeix la citocina (autocrina), però en molt casos hi ha efectes importants a altres òrgans i teixits (endocrina). Una mateixa cèl·lula pot produir diferents citocines i a més una mateixa citocina pot ser produïda per diferents tipus cel·lulars i pot realitzar la seva funció sobre una o més cèl·lules (15,234,369).

4.1.2. Citocines pro-inflamatòries

IL-1, IL-6 i TNF- α es coneixen com les citocines inflammatòries, ja que es produeixen coordinament i realitzen funcions sinèrgiques i solapades en el temps en la regulació de la inflamació (15,369). IL-1 junt amb IL-6 són produïdes per diferents tipus cel·lulars, però els principals productors in vivo són els macròfags/monòcits activats, fibroblasts i cèl·lules endotelials. TNF- α deriva principalment de macròfags/monòcits, però també es produït per limfòcits T. Nombrosos agents indueixen la producció de IL-1, IL-6 i TNF- α a macròfags/monòcits com microorganismes, productes microbians, agents

inflamatoris, etc. Les accions de IL-1, IL-6 i TNF- α poden ser locals (paracrina) i/o sistèmiques (endocrina). Les accions paracrines inclouen promoure l'adherència dels leucòcits a cèl·lules endotelials, augmentar la permeabilitat vascular i junt amb IFN- γ estimular a neutròfils i macròfags/monòcits la producció de radicals lliures d'oxigen i nitrogen i proteases per destruir el microorganisme (274).

4.1.3. Citocines i trasplantament

Experiments fets amb rosegadors han demostrat que empelts al·logènics d'illots pancreàtics pateixen rebuig (334), reparació de l'autoimmunitat si es realitza a animals susceptibles a la diabetis i a més molts empelts també poden presentar problemes de no funció primària (159). El terme de no funció primària està associat al concepte de no funcionalitat de les cèl·lules beta, tant per problemes de funció com per pèrdua de les cèl·lules beta després del trasplantament. Aquesta no funció primària s'ha descrit també en empelts d'illots singènics (237), indicant que mecanismes diferents al rebuig i a l'autoimmunitat estarien involucrats en el procés de pèrdua primerenca de l'empelt després del trasplantament. S'ha hipotetitzat que aquesta no funció primària podria ser deguda a l'exposició dels illots implantats a un microambient citotòxic que conduiria a un procés d'inflamació no-específica. Aquesta inflamació induiria una inhibició de la funció i fins i tot una destrucció dels illots. Es coneix que es produeixen citocines de forma local durant el rebuig d'òrgans vascularitzats (67) i s'ha suggerit que la producció de citocines pot jugar un paper tant en el rebuig com en la no funció primària dels illots pancreàtics (159).

El paper dels macròfags en el microambient al qual estan exposats inicialment els illots s'ha suggerit en diferents estudis, en què s'ha allargat la supervivència de l'empelt amb un tractament amb agents anti-macròfag com la sílica (159) i la deoxispergualina (160). Els macròfags residents als illots poden alliberar diferents mediadors citotòxics com citocines proinflamàtores i NO. En l'únic estudi realitzat sobre l'expressió de citocines en empelts d'illots de rata es va detectar l'expressió de IL-1 α tant en empelts al·logènics com

singènics. El dia després del trasplantament l'expressió de IL-1 α estava augmentada tant en empelts al·logènics com singènics i l'expressió es mantenia fins al dia 7 després del trasplantament, havent-se especulat que la IL-1 α podia ser produïda pels macròfags que intervenen en la inflamació no-específica en resposta a dany produït durant el trasplantament (250).

Les diferents dades donen suport a la hipotèsi que la funció i la supervivència de l'empelt d'illots es poden veure afectades per la producció local de citocines, però el coneixement de què es disposa sobre l'expressió de citocines en empelts d'illots i en particular en els primers dies després del trasplantament és molt escàs.

4.1.4. IL-1 β

La IL-1 β és un mediador i un modulador clau d'un ampli rang de respostes fisiològiques importants per la supervivència produït per una gran varietat de cèl·lules, incloent cèl·lules del sistema immune i neurones.

4.1.4.1. Gen IL-1 β

El gen de la IL-1 β és un gen de 9.7 Kb que es troba situat al cromosoma 2 a humans i ratolins. La regió codificant conté 7 exons separats per 6 introns. La regió promotora del gen de IL-1 β a més de contenir diferents llocs d'unió de factors de transcripció com altres promotors com per exemple la caixa TATA o la caixa CAAT conté també regions d'unió de factors específics de teixit. A la regió 5' existeix una altra regió reguladora anomenada upstream DNA regulatory region que inclou llocs d'unió d'elements de resposta a AMPc, glucocorticoids i LPS i de diferents factors de transcripció com el factor nuclear kappa B (NF κ B) (359) (Fig.12.).

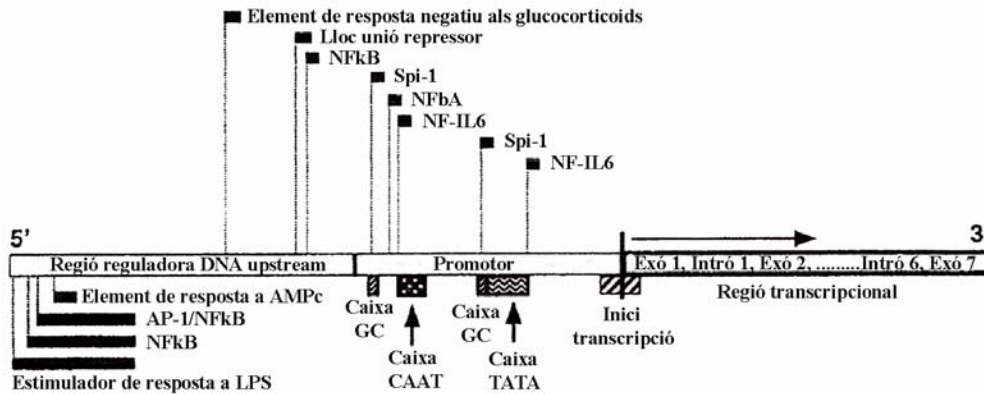


Fig.12. Esquema del gen de la IL-1 β . Aquest diagrama prové d'estudis del gen de la IL-1 β de ratolí i humana mitjançant DNA genòmic. Modificat de Watkins LR., et al., 1999.

NF κ B és un dels factors de transcripció més coneguts i més ampliament estudiats que activen la transcripció del gen de la IL-1 β . En la majoria de les cèl·lules, NF κ B es troba segregat en el citoplasma, degut a la seva associació amb una proteïna inhibidora específica anomenada I κ B (25). Després de l'activació de la cèl·lula i la fosforilació de I κ B, NF κ B es alliberat d'aquest complex i translocat al nucli, on interacciona amb el DNA per regular la transcripció del gen (178).

4.1.4.2. Proteïna IL-1 β

IL-1 β és un membre d'una família de molècules que inclou tres lligands (IL-1 α , IL-1 β i l'antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra)), dos receptors de membrana (IL-1R1 i IL-1R2), una proteïna quinasa associada al receptor de IL-1 (IRAK), una proteïna accessòria al receptor de IL-1 (IL-1RAcP) i diferents receptors solubles (76). El senyal induït pels dos lligands agonistes es transmet via el mateix receptor, mentre que IL-1ra no indueix la transducció del senyal. Hi ha dos receptors per la IL-1: el receptor de IL-1 de tipus 1 i 2 (IL-1R1/2) i la cèl·lula beta expressa els dos receptors. El receptor IL-1R1 és de

baixa afinitat i l'encarregat de transmetre el senyal, mentre que el receptor IL-1R2 és d'alta afinitat i només és un receptor esquer (77).

4.1.4.3. Vies de transducció del senyal induïdes per la IL-1 β

La unió de la IL-1 al receptor IL-1R1 provoca un canvi conformacional que permet la unió de la proteïna accessòria del receptor IL-1AcP al complex IL-1/IL-1R1, la unió de la qual és clau per la senyalització de la IL-1. La transducció del senyal induït per la IL-1 activa principalment tres vies de senyalització: la via d'activació del factor NF κ B, la via de la PKC i la via de les MAPK (Fig.13.). La quinasa activada pel IL-1R1 (IRAK) s'uneix al complex IL-1/IL-1R1/IL-1AcP via la proteïna adaptadora MyD88, la qual s'expressa a cèl·lules beta (80). IRAK interacciona amb el factor 6 associat al receptor TNF (TRAF6), el qual s'ha proposat que tindria un paper en l'activació de NF κ B via la quinasa inductora de NF κ B (NIK). NIK activaria una quinasa (IKK) que provocaria la fosforilació i la degradació de la proteïna inhibidora I κ B, permetent l'alliberament de NF κ B que es traslocaria al nucli on induiria la transcripció de gens com iNOS o Fas (115).

Per altra banda la PI3K també s'activa de forma important després de la unió de la IL-1 β al receptor, unint-se al complex IL-1/IL-1R1 (280). Es creu que estaria implicada en la via de senyalització induïda per la IL-1 β activant NF κ B i AP-1. A més la PI3K regularia l'activitat PKB i PKC (21). La PKB estaria implicada en l'activitat de la via del NF κ B i la PKC activaria el factor de transcripció C/EBP β participant possiblement en la inducció de respostes de defensa/reparació després de l'exposició a citocines. Els membres de la superfamília de les MAPK implicats en la inducció de l'expressió de iNOS mitjançada per la IL-1 β serien les quinases p38 i ERK, però es creu que caldrien altres vies per la inducció final de l'expressió del gen iNOS. Per altra banda la IL-1 β també activaria un altre membre de les MAPK, JNK, que conduiria finalment a la inducció de l'apoptosi (98).

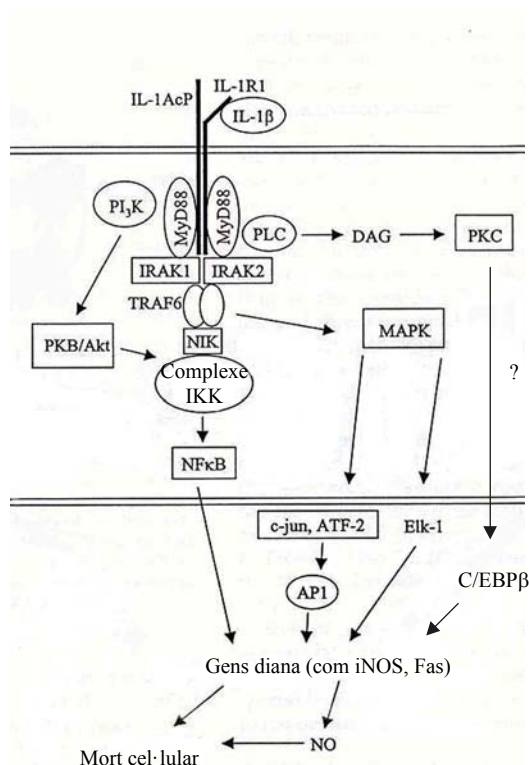


Fig.13. Esquema dels mecanismes de senyalització activats per la IL-1 β . Modificat de Eizirik DL, et al., 2001.

La via del NF κ B activada per la IL-1 β indueix l'expressió del gens iNOS i Fas, els quals estan implicats en la mort cel·lular beta. En estudis tant de línies d'insulinomes de rata com d'illots de rata adulta (95,156) s'ha descrit que la IL-1 β indueix l'expressió de l'enzim iNOS a cèl·lula beta i per tant activa la producció de NO, el qual pot ser responsable de la mort de les cèl·lules beta induïda per les citocines. En el cas d'illots humans es necessitaria l'exposició a la combinació de les tres citocines (IL-1 β + TNF- α + IFN- γ) per la inducció de l'expressió de iNOS (96).

Per altra banda a cèl·lules beta humanes purificades la IL-1 β és capaç d'induir el receptor Fas després d'una incubació de 24 h amb la IL-1 (323). Aquest augment de l'expressió podria explicar la mort induïda per citocines in vitro, ja que el lligand de Fas s'expressa de forma constitutiva als illots humans (193) i la seva unió activaria el procés de mort per apoptosi. Però la implicació del receptor Fas en la mort induïda per la IL-1 β

en illots de rata no és tant clara. Les rates del voltant de 2-3 mesos d'edat que normalment s'utilitzen per investigació no expressen el lligand de Fas als illots pancreàtics (130) i per tant la via del Fas/FasL no semblaria que estigués implicada en la mort cel·lular beta induïda per la IL-1 β en illots de rata.

4.1.4.4. IL-1 β i cèl·lula β

L'estudi de les citocines com a agents implicats en els mecanismes de mort de la cèl·lula beta es va iniciar després de l'observació que l'addició de IL-1 β a illots de rata aïllats provocava la pèrdua de funció i dany de la cèl·lula beta (205). Per tant podríem classificar els efectes de la IL-1 β sobre cèl·lula beta com bàsicament efectes sobre la funció i/o la supervivència de la cèl·lula beta.

- Efectes sobre la funció de la cèl·lula beta

La primera evidència que les citocines podien influenciar la funció de les cèl·lules de l'illot es va tenir quan es van afegir sobrenedants de cultius de macròfags humans a illots pancreàtics de rata en cultiu i es va observar la inhibició de la secreció d'insulina (206). Més tard, es va demostrar que el principal factor inhibidor era la IL-1 (207,28).

Els illots pancreàtics exposats a IL-1 β presentaven una alteració del metabolisme mitocondrial (92,298) i es demostrà que la IL-1 β induïa a illots pancreàtics de rata (363) i ratolí (365) una forta inhibició de l'enzim del cicle de Krebs, aconitasa. Aquest fet podria provocar un defecte del metabolisme de la glucosa conduint a una disminució de la producció de ATP que comportaria una inhibició del procés de secreció d'insulina. Com es va demostrar en tractar illots de rata amb IL-1 β durant 18-24 h fet que causava una potent inhibició de l'activitat de l'enzim mitocondrial aconitasa, de la síntesi proteica i de la secreció d'insulina (304). A més quan els illots de rata s'exposaven a IL-1 β durant 48 h s'observava una reducció del contingut de ATP de fins el 40 % (299).

El grau d'inhibició de la secreció depèn de les concentracions de IL-1 β , sent màxima (95%) a una concentració de 5 U/ml (140). La dependència de la IL-1 β del temps per exercir els seus efectes inhibitoris es va demostrar quan s'exposaven illots de rata a IL-

1 β durant un període curt (<5h) i llarg de temps. En períodes curts no hi havien quasi efectes en la secreció d'insulina estimulada per glucosa, mentre que exposicions més llargues conduïen a una inhibició potent de la secreció d'insulina. Aquesta dependència del temps pot ser deguda a que la inhibició de la secreció d'insulina requereix tant la transcripció de gens com la síntesi proteica *de novo* (214).

L'acció inhibidòria de la IL-1 β és reversible tant a illots intactes com a cèl·lules beta purificades, malgrat que aquestes últimes serien més sensibles que els illots a la supressió de la síntesi de la insulina induïda per la IL-1. Illots de rata incubats durant 15 h amb IL-1 β requereixen només 4 dies d'incubació amb medi lliure de citocina per restablir la secreció d'insulina estimulada per glucosa (59,251). A més la inhibició és aparentment específica de cèl·lula beta (274), ja que no s'inhibeix la secreció de glucagó per part de les cèl·lules alfa (Ling). Una atractiva explicació de la toxicitat selectiva de la IL-1 β podria ser la inducció de l'expressió de l'enzim iNOS només a cèl·lules beta (93,156) i no a cèl·lules no beta purificades (60,331). El NO produït inhibeix l'aconitasa ja que afegeix grups nitrosil en els grups Fe-S del centre actiu de l'enzim, provocant la disminució de la producció d'ATP i la inhibició de la secreció de la insulina. Aquest fet va ser demostrat en observar-se que l'augment de la producció de NO en illots tractats amb IL-1 β correlacionava amb la potent inhibició de la secreció d'insulina estimulada per glucosa, ja que els inhibidors de l'òxid nítric sintasa com l'aminoguanidina (AG) o el N-mono-metil-L-arginina (NMMA) en prevenien la inhibició (90,60,64,65,317). Per tant aquestes dades indicarien que la inhibició de la secreció d'insulina i de la funció metabòlica de l'illot davant l'exposició a IL-1 β seria deguda a un augment de la producció de NO.

Es coneix que existeix una variabilitat en la sensibilitat de les cèl·lules beta de diferents espècies a les citocines. Els mecanismes anteriorment proposats que condueixen a la inhibició de la funció de la cèl·lula beta estan principalment relacionats amb fets que tenen lloc a cèl·lules d'illots de rata. La inhibició de la secreció d'insulina també té lloc a cèl·lules beta de ratolí davant l'exposició a IL-1, però els illots de ratolí són més resistents al seus efectes que els de rata. A més sembla que la inhibició de la secreció d'insulina no

està relacionada amb la inhibició del metabolisme de la glucosa (91,93). Malgrat que hi ha una important formació de NO, la inhibició de l'activitat aconitasa és menor en els illots de ratolí que en els de rata (365). A més en illots de ratolins knockout per iNOS (iNOS^{-/-}) l'exposició a IL-1 β inhibeix igualment la secreció d'insulina estimulada per glucosa, suggerint que mecanismes no dependents de NO estarien implicats en aquesta inhibició (10). Per altra banda preparacions d'illots humans exposats a IL-1 β sota condicions en què la funció de les cèl·lules beta de rosegadors es troba severament alterada no presenten cap efecte inhibidor en la funció (162) i fins i tot es produeix una estimulació (94). Aquest fet es pot atribuir a una manca d'inducció de la producció de NO a illots humans després de la incubació únicament amb IL-1 β (94). Per tant s'ha suggerit que en illots humans es requereix la combinació de diferents citocines, particularment s'ha estudiat la IL-1, el TNF α/β i el IFN γ , per provocar una inhibició funcional de les cèl·lules beta. Però altres estudis han mostrat que l'exposició d'illots humans a únicament IL-1 β provoca la producció de NO, augment de l'expressió del gen Fas i supressió funcional dels illots (113). Aquesta discrepància en els resultats de diferents estudis d'illots humans s'ha proposat que podria ser deguda a diferències entre les preparacions d'illots en relació a la composició cel·lular o la concentració hormonal (Liu).

- Efectes sobre la mort de la cèl·lula beta

Diferents estudis han descrit que la IL-1 β sola o en combinació amb el TNF- α i el IFN- γ condueix a la disfunció i mort de cèl·lules de l'illot (205,97). L'exposició d'illots de rata en cultiu a IL-1 β comporta la disminució de la supervivència de les cèl·lules beta (208,214,298). Aquest efecte citotòxic de la IL-1 β no és específic de cèl·lula beta, ja que es moren tant les cèl·lules alfa com les beta (184). Aquesta mort en part seria deguda a apoptosi ja que s'ha descrit la presència de la fragmentació del DNA característica de l'apoptosi en la destrucció de les cèl·lules beta exposades a IL-1 β (273). A més s'ha observat que la IL-1 β indueix a cèl·lules de la línia cel·lular de rata RINm5F augmentos en el contingut de ceramides, molècules implicades en la inducció de l'apoptosi (364). Altres elements que estan implicats en la cascada de senyalització que condueix a l'apoptosi són els factors de transcripció c-jun i c-fos, els quals també s'indueixen a illots de rata i a

cèl·lules RINm5F davant l'exposició a IL-1 β (169). A més també hi ha una important mort de les cèl·lules beta per necrosi, la qual estaria probablement relacionada amb la producció de NO (187, 386).

En el cas de cèl·lules beta purificades de ratolí es requereix la combinació de citocines per induir la mort cel·lular, conduint a la mort tant per necrosi com per apoptosi (137,139, 257,187,188). Per contra a illots humans la combinació de citocines és capaç d'induir talls en el DNA i d'augmentar el número de cèl·lules apoptòtiques mitjançant un mecanisme independent de NO, però sense quasi signes de mort per necrosi (73).

En resum, aquestes dades indiquen que la IL-1 β pot induir la mort de les cèl·lules beta a illots de rata i a cèl·lules beta dispersades (79,208,214,298), tant per apoptosi com per necrosi. Per altra banda les combinacions de citocines principalment induïrien apoptosi a cèl·lules beta d'illots humans (73), mentre que comportaria la mort tant per necrosi com per apoptosi a cèl·lules beta d'illots de ratolí (257,187).

4.2. Òxid nítric

L'òxid nítric (NO) va ser descrit inicialment a vasos sanguinis com un factor relaxant derivat de l'endoteli (EDRF), però actualment es conegut com un missatger fonamental en una gran varietat de cèl·lules amb un ampli espectre d'accions biològiques. NO és el primer gas conegut que actua com a missatger biològic a mamífers. Difon a través de les membranes cel·lulars reaccionant amb altres espècies com O₂, radicals peròxid, superòxid o acomplexant-se amb metalls. In vivo NO es forma a partir de L-arginina generant com a coproducte L-citrulina, té una vida mitja curta i ràpidament es descomposa per condensació amb una molècula d'oxigen en nitrit i nitrat. Abans de la seva descomposició la molècula altament reactiva de NO reacciona amb diferents molècules diana específiques exercint així els seus efectes citotòxics i de missatger (321).

4.2.1. Òxid nítric sintases

Les òxid nítric sintases són els enzims responsables de la síntesi de NO a teixits de mamífers. S'han aïllat i seqüenciat tres isoformes d'òxid nítric sintases codificades per gens diferents amb una homologia del 50-60% (170). Les isoformes constitutives són NOS1 (nNOS), clonada a cèl·lules neuroectodermals, i NOS3 (eNOS) clonada a cèl·lules endotelials. Aquests enzims es troben normalment presents a neurones i cèl·lules endotelials respectivament, s'activen per calci/calmodulina i alliberen quantitats picomolars de NO en resposta a l'estimulació (168). Principalment estan involucrats en el procés de neurotransmissió i en la regulació de la pressió sanguínia. A més del seu paper en el sistema cardiovascular com a neurotransmissor, el NO inhibeix l'agregació plaquetària i la proliferació de les cèl·lules musculars llises.

La tercera isoforma NOS2 (iNOS) va ser clonada originalment a macròfags activats de ratolí (191,196,376), però pot expressar-se a la majoria de cèl·lules nucleades estimulades amb citocines i/o productes bacterians. L'enzim requereix síntesi *de novo* i la seva unió a la calmodulina és independent de Ca^{+2} . Produeix més NO que les formes constitutives durant períodes llargs de temps (200,377). La producció de NO en excés induïda per citocines per part de iNOS participa en reaccions immunològiques i de defensa de l'hoste i pot jugar un paper com a molècula efectora en malalties autoimmunes.

4.2.2. Òxid nítric i cèl·lula beta

Hi ha certa controvèrsia sobre si als illots pancreàtics existeixen dues isoformes de NOS: una isoforma constitutiva i una induïble. S'ha proposat que la secreció d'insulina induïda per glucosa requereix la formació de NO i que el NO podria estar involucrat en la via de senyalització que condueix a la secreció d'insulina (320). Alguns investigadors han mostrat evidències de la presència d'una isoforma constitutiva de l'òxid nítric sintasa localitzada a l'endoteli vascular i a les cèl·lules alfa i delta que podria estar implicada en aquesta funció del NO (5,320).

Per altra banda les cèl·lules beta dels illots produeixen NO a través de l'activació de l'enzim iNOS induïda per citocines, fet que causa la mort de les cèl·lules beta (61). El paper del NO en la destrucció autoimmune o induïda per citocines de les cèl·lules beta s'ha estudiat de forma extensa (205,63,87). Diferents vies s'han suggerit ser les responsables de la mort de cèl·lules beta mitjançada pel NO:

1) NO inactiva l'enzim aconitasa del cicle de Krebs. Fet que com hem comentat en l'apartat 4.2-2. inhibeix l'oxidació de la glucosa i la generació d'ATP, provocant la mort de les cèl·lules per necrosi (363).

2) NO causa dany en el DNA a través de la inducció de talls a les cadenes de DNA. En illots de rata exposats a un donador de NO o a macròfags activats es van detectar talls en el DNA i posteriorment mort de les cèl·lules de l'illot per necrosi (100). Els talls en el DNA poden causar directament necrosi o indirectament via l'activació de mecanismes de reparació del DNA com la inducció de l'enzim poli(ADP ribosa) polimerasa. L'activació d'aquest enzim pot provocar la mort de les cèl·lules beta degut a la disminució dels nivells de NAD^+ , que la poli(ADP ribosa) polimerasa consumeix (134).

3) Els talls produïts en el DNA induïts pel NO poden ser suficients per induir la mort per apoptosi a través de l'activació de la proteïna p53 (224). La proteïna p53 és el producte d'un gen supressor de tumors i l'augment dels nivells intracel·lulars de p53 condueix a una aturada del cicle cel·lular en fase G1, molt probablement per permetre la reparació del dany en el DNA o per activar la mort per apoptosi si el dany és molt gran. Així mateix p53 pot actuar com a factor de transcripció regulant directament l'expressió dels gens de la família del Bcl-2, fet que podria ser important en la inducció de l'apoptosi per part de p53 (128). En cèl·lules de la línia RINm5F tractades amb donadors químics de NO o amb IL-1 β s'indueix la mort per apoptosi i la inducció de l'expressió del gen p53, però únicament en les cèl·lules tractades (224).

4) Diferents evidències suggereixen l'existència d'una altra via per la qual les cèl·lules beta moren per apoptosi degut a l'exposició a certes citocines i a NO. L'exposició de les cèl·lules HIT-T15 a anàlegs de cGMP ha permès reproduir els efectes citotòxics d'un donador de NO, concretament es produïa la inducció d'apoptosi. Aquest fet suggeria que la mort per apoptosi induïda per NO estava precedida per un augment en els nivells de cGMP i que per tant el procés involucra l'activació de proteïnes quinasa dependent de cGMP (192).

Per estudiar els efectes del NO induït per citocines sobre la cèl·lula beta s'han utilitzat inhibidors de iNOS i ratolins genèticament deficients en iNOS (iNOS^{-/-}). Els inhibidors de iNOS no són gaire específics i poden bloquejar altres isoformes de l'enzim i a més aquests agents interfereixen directament sobre la funció de la cèl·lula beta. Per aquesta raó es van desenvolupar ratolins deficients genèticament en l'enzim. Els illots d'aquests ratolins deficients en iNOS presenten la inhibició de la secreció d'insulina induïda per glucosa davant l'exposició a IL-1 β , demostrant que les citocines poden induir una alteració de la funció dels illots de rosegadors in vitro mitjançant mecanismes independents de NO. Per altra banda en aquests illots de ratolí deficients en iNOS^{-/-} l'exposició a IL-1 β no provocava un augment de la mort cel·lular (10). En un estudi fet en cèl·lules beta de la línia cel·lular RIN la producció de NO induïda per IL-1 β no provocava fragmentació del DNA, dany mitocondrial o destrucció cel·lular (333). Per altra banda també s'ha descrit que la nicotinamida, que evita la destrucció de cèl·lules beta induïda per citocines, no bloqueja completament la producció de NO a illots de rosegadors en cultiu (52). Per tant malgrat que la producció de NO és necessària, no és suficient per causar la mort induïda per IL-1 β a cèl·lules beta de rata.

Per altra banda quan les cèl·lules beta purificades a partir de ratolins iNOS^{-/-} eren exposades a la combinació de citocines IL-1 β , TNF- α i IFN- γ s'evitava la mort per necrosi quasi completament, però les cèl·lules seguien morint per apoptosi (187). Aquest fet suggeria que la inducció de NO per les citocines principalment provoca la mort per necrosi de les cèl·lules beta de ratolí i amb només una petita aportació de la via apoptòtica. La

progressió de mort cel·lular cap a apoptosi o necrosi pot dependre del contingut de ATP cel·lular. Si els nivells de ATP disminueixen sota uns nivells crítics després del dany proapoptòtic es produeix la mort per necrosi, mentre que quan els nivells de ATP estan parcialment preservats el procés d'apoptosi pot completar-se (177). S'ha suggerit que les cèl·lules dels illots de rosegadors exposades al senyal de mort induïda pel NO desenvolupen de forma primerenca una disfunció mitocondrial que comportarà la disminució de la producció de ATP i la mort fonamentalment per necrosi (272).

L'apoptosi induïda per citocines a illots humans probablement sigui independent de la generació d'òxid nítric (73). La inhibició de iNOS en un model de diabetis in vivo només provocava un retard i no una protecció davant el desenvolupament de la diabetis (62,182,195). Per tant en illots humans altres mecanismes estarien implicats en la mort de les cèl·lules beta induïda per citocines poden ser necessaris, per exemple altres vies inductores d'apoptosi com el sistema Fas-FasL (379).

Totes les dades conclouen que malgrat que el NO és capaç de provocar la mort de les cèl·lules de l'illot bàsicament per necrosi, poden existir altres mecanismes involucrats a més de la producció de NO en l'apoptosi induïda per citocines.

5. Diabetis Mellitus: etiopatogènia i trasplantament d'illots de Langerhans

5.1. Etiopatogènia de la Diabetis Mellitus tipus 1

La Diabetis Mellitus tipus 1 (DM-1) és una malaltia autoimmunitària causada per un atac selectiu contra les cèl·lules beta pancreàtiques productores d'insulina. La destrucció de les cèl·lules beta de l'illot comportarà la insulino-dependència dels pacients. DM-1 és una malaltia que normalment apareix en individus joves i que afecta actualment al voltant del 0.5 % de la població a països desenvolupats (211).

Malgrat els avenços en la caracterització de la immunologia de la DM-1, se'n desconeix la causa directa o el factor desencadenant, tot i que s'han postulat diverses hipòtesis, i no es té una visió clara del mecanisme efector final del procés. El que sí es coneix és que es tracta d'una malaltia amb components de predisposició: s'han identificat factors genètics i ambientals que farien que uns individus presentessin més facilitat per desenvolupar DM-1. Dins dels factors genètics els gens que codifiquen per les molècules HLA de classe 2 han estat ampliament associats amb la DM-1. Per altra banda dins dels factors ambientals els possibles candidats són virus, toxines i factors de la dieta. Davant de la dificultat d'estudiar aquests teixits humans, molts investigadors han optat per models animals de diabetis, en particular pel ratolí diabètic no obès (NOD) i derivats transgènics d'aquest.

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

La participació de cèl·lules del sistema immunitari en el procés de destrucció que condueix a la malaltia fa que es classifiqui com a malaltia autoimmunitària: la immunitat cel·lular i concretament els limfòcits T porten a terme una tasca rellevant en l'atac i la destrucció de les cèl·lules beta. Prèviament a la destrucció de les cèl·lules beta té lloc un procés que es caracteritza per la invasió dels illots amb una barreja de població

leucocitària que s'anomena insulinitis. Posteriorment quan la majoria de les cèl·lules beta ha mort hi ha una producció d'insulina insuficient que impedeix regular els nivells de glucosa, provocant la hiperglicèmia.

DM-1 és una malaltia primàriament conduïda pels limfòcits T (23,347). Les anàlisis histològiques mostren que la majoria dels leucòcits que infiltrin l'illot durant el procés d'insulinitis són cèl·lules T. Tant els limfòcits CD4⁺ o helpers com els limfòcits CD8⁺ o citotòxics possiblement siguin necessaris per l'aparició de la malaltia (23,347). Els limfòcits T nadius reactius davant la cèl·lula beta normalment es troben circulant per la sang i els òrgans limfòids i no tenen accés als teixits. Quan antígens derivats de les cèl·lules beta com la insulina, àcid glutàmic descarboxilasa (GAD) i Tyr fosfatases són recollits per les cèl·lules presentadores d'antígens (APCs) s'indueix la seva maduració i migració cap als nòduls limfàtics pancreàtics. Aquí els limfòcits T entraran en contacte amb els antígens de cèl·lules beta activant-se, fet que els conduirà a adquirir l'habilitat de migrar a teixits. Posteriorment els limfòcits T es trobaran als illots amb antígens que reconeixeran, es reactivaran i iniciaran el procés d'insulinitis. S'ha proposat que el factor iniciador del procés podria ser una onada fisiològica de mort de cèl·lules beta que permetria que antígens procedents de les cèl·lules beta puguin ser recollits per APCs (211,102). Aquest fet tindria conseqüències patològiques per aquells individus propensos a la diabetis, els quals tenen un gran ventall de limfòcits T autoreactius que podrien activar-se davant antígens de cèl·lules beta i que a més poden estar subjectes a factors de susceptibilitat addicionals com factors genètics o ambientals.

Hi ha poca informació definitiva respecte de com es produeix aquest atac que comporta la destrucció de les cèl·lules beta en la diabetis tipus 1. Però s'han proposat dos mecanismes principals implicats en la mort de les cèl·lules beta (23,347):

- 1) mecanisme lligat a reconeixement (recognition-linked): es basa en el reconeixement per part dels limfòcits T citotòxics dels autoantígens que es troben presentats a la superfície de la cèl·lula beta mitjançant les molècules del complex major d'histocompatibilitat (MHC), provocant la mort de les cèl·lules per reconeixement directe de l'antigen a les cèl·lules beta (Fig.14.). Principalment s'ha estudiat la via de

la perforina/granzim i/o les interaccions Fas-FasL en la destrucció de les cèl·lules beta per part dels limfòcits T. Per tant en aquest mecanisme proposat es requeriria el contacte entre cèl·lules beta i limfòcits T. A més els limfòcits T actuarien a la vegada sobre macròfags activats que facilitarien la destrucció dels illots mitjançant un mecanisme dependent de NO (125).

La via de la perforina /granzim és la principal via de mort induïda pels limfòcits T citotòxics. La perforina és una molècula associada a grànuls de cèl·lules citotòxiques que pot inserir-se a la membrana de la cèl·lula diana i formar porus provocant una lisi osmòtica (forma de mort no-apoptòtica). Aquesta hipòtesi està molt fortament qüestionada ja que ratolins NOD transgènics deficientes en perforina desenvolupen diabetis de forma més freqüent que els corresponents ratolins amb perforina (7).

Per altra banda Fas s'expressa a limfòcits activats i a diferents tipus cel·lulars i és probablement el principal receptor de membrana que trasmet senyals de mort cap a l'interior. El FasL s'expressa també a limfòcits activats i la seva unió a cèl·lules que presenten el receptor Fas a la membrana comporta l'activació de la mort de la cèl·lula diana per apoptosi. En estudis in vitro s'ha observat que citocines com IL-1 augmenten l'expressió de Fas a cèl·lules beta dependent de NO (322,379); en estudis in vivo però han aparegut resultats contradictoris. Ratolins NOD deficientes en Fas són resistents a la diabetis espontània i als limfòcits T diabetogènics (54,143). Però per altra banda anticossos anti-FasL fracassen en la inhibició de la diabetis (167). Per tant el paper de Fas/FasL en la mort de les cèl·lules beta és encara poc clar.

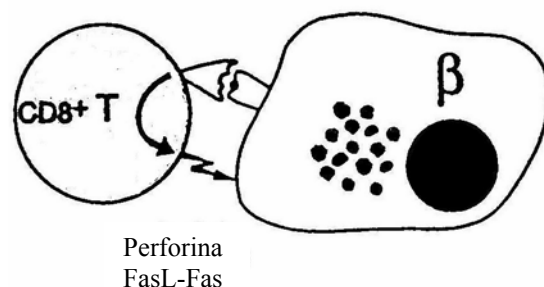


Fig.14. Esquema de la destrucció de les cèl·lules beta d'acord amb el mecanisme lligat a reconeixement. Modificat de Mathis D, et al., 2001.

2) mecanisme lligat a activació (activation-linked): és un mecanisme indirecte pel qual només la proximitat de les cèl·lules beta a aquests limfòcits T provoca la seva mort (Fig.15.). D'acord amb la hipòtesi, autoantígens de les cèl·lules beta serien recollits per APCs (macròfags o cèl·lules dendrítiques) residents o reclutats als illots i presentarien els autoantígens a limfòcits T $CD4^+$ reactius. Com a resultat de la interacció limfòcit T/APCs, els limfòcits T activats poden destruir directament les cèl·lules beta veïnes, per exemple a través de la via de la perforina o per interaccions Fas-FasL o també produint mediadors solubles que indueixen la mort de les cèl·lules beta o activen als macròfags propers. A la vegada les pròpies cèl·lules beta podrien sintetitzar mediadors solubles capaços de participar en el procés de destrucció. La natura dels mediadors solubles implicats és controvertida, però s'han implicat en el procés l'IFN- γ , la IL-1 β , el TNF- α , la IL-6 i NO, mediadors que s'han descrit extensament que poden causar la destrucció de les cèl·lules beta in vitro (205).

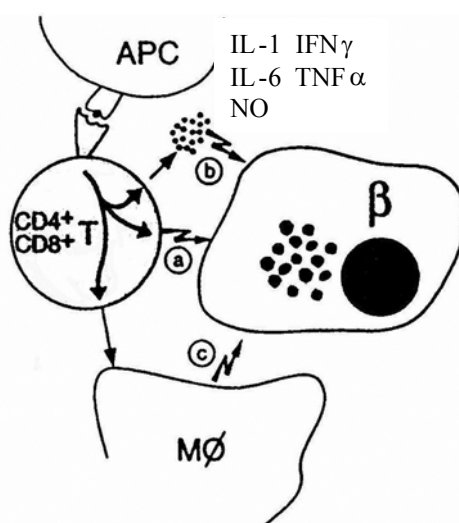


Fig.15. Esquema de la destrucció de les cèl·lules beta d'acord amb el mecanisme lligat a activació. Modificat de Mathis D, et al., 2001.

Tots aquests estudis suggereixen que la destrucció de les cèl·lules beta en la DM-1 depèn de la interacció entre macròfags i limfòcits $CD4^+$ i $CD8^+$ que provoquen una lesió

inflamatòria crònica, en la qual mediadors solubles com NO i citocines són unes molècules efectores importants.

5.2. Etiopatogènia de la Diabetis Mellitus tipus 2

El 90% dels casos de Diabetis Mellitus són de l'anomenat tipus 2 (DM-2) (32). La DM-2 o no insulíndependent és un trastorn metabòlic caracteritzat per l'aparició d'hiperglicèmia com a conseqüència d'alteracions en la secreció d'insulina i en l'acció d'aquesta al fetge i als teixits perifèrics, fonamentalment al múscul.

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

La DM-2 es manifesta clínicament quan les cèl·lules beta no poden compensar la resistència a la insulina augmentant la secreció d'insulina. Aquest augment de la secreció d'insulina es pot aconseguir mitjançant una més gran secreció d'insulina per cèl·lula o, com s'ha observat en rosegadors, augmentant la massa cel·lular beta (41). Un fet que podria agreujar aquesta manca de capacitat de compensar la resistència a la insulina pot ser la presència d'una massa beta reduïda observada en aquests pacients amb DM-2, malgrat que hi ha algun estudi que ha qüestionat la menor massa beta en aquests pacients (324,368, 277,56). Per altra banda els pacients presenten múltiples anomalies en la secreció d'insulina com l'absència de pulsació en la secreció, absència de la primera fase de secreció i disminució de la segona fase de secreció en resposta a glucosa o augment de la secreció de proinsulina.

Potser el tema més candent seria quin és el fet metabòlic primari: si hi ha una alteració en la pauta normal de secreció d'insulina o anomalies en l'acció de la insulina a teixits perifèrics (343). Experiments en què defectes en la secreció o l'acció de la insulina han estat induïts a ratolins mitjançant la modificació d'un o diferents gens (227,154)

sorprenentment no han estat tant clarificadors com s'esperava. Possiblement aquestes estudis genètics només serveixin per emfatitzar la naturalesa multi-factorial de la Diabetis Mellitus, pel qual diferents defectes són necessaris per provocar una disfunció suficient per superar els mecanismes de compensació fisiològica i produir la diabetis.

Malgrat tot s'ha postulat una sèrie de fets per explicar l'evolució de la DM-2 (72). D'acord amb aquest model, primer hi hauria una resistència perifèrica a la insulina, però que inicialment seria compensada amb una millora de la secreció de la insulina. Posteriorment la cèl·lula beta no podria seguir compensant aquestes necessitats d'insulina i hauria primer una relativa deficiència que acabaria amb una reducció absoluta de la hormona. A la vegada, el fetge desenvolupa resistència a la insulina, conduint a una important producció de glucosa. Sigui quina sigui la seqüència exacta dels diferents fets pels quals la tolerància a la glucosa condueix a la diabetis, no hi ha gaires dubtes sobre el fet que la resistència a la insulina és un component important de la malaltia, però que per a què aquesta es produeixi cal un defecte en la capacitat de compensació per part de les cèl·lules beta.

5.3. Trasplantament d'illots de Langerhans

Una de les alternatives més atractives de futur pel tractament de la Diabetis Mellitus és el trasplantament d'illots pancreàtics. El trasplantament d'illots permetria aportar la insulina necessària, en el cas de la DM-1, degut a la manca de les cèl·lules beta productores d'insulina, però no cal descartar el trasplantament de pacients amb DM-2, els quals presenten un defecte en la secreció d'insulina. Per tant el trasplantament de cèl·lules productores d'insulina podria corregir els defectes secretors presents en aquests pacients.

5.3.1. Trasplantament de pàncrees versus trasplantament d'illots

Fins ara l'únic camí per restablir la normoglicèmia en diabetis tipus 1 a llarg termini era el trasplantament d'un pàncrees vascularitzat. Actualment entre el 70-80% dels pacients que reben un trasplantament de tot el pàncrees aconseguen mantenir la

insulino-independència durant un mínim de tres anys amb una normalització dels nivells de hemoglobina glicosilada (354). Durant l'última dècada s'han demostrat els avantatges d'aquesta teràpia de substitució de les cèl·lules endocrines davant del diari ritual d'injeccions subcutànies d'insulina millorant de forma substancial la qualitat de vida dels pacients. A més diferents estudis han suggerit que el trasplantament de pàncrees vascularitzats pot prevenir i disminuir la progressió de complicacions degudes a la diabetis com la nefropatia, la retinopatia i la neuropatia (104,238). Per altra banda uns dels més importants desavantatges del trasplantament de pàncrees són el complex procediment quirúrgic i la necessitat d'immunosupressió al llarg de tota la vida, fets que comporten uns alts índexs de morbiditat i mortalitat entre els pacients, del 70% (45,295,306) i 9% (335) respectivament.

En comparació amb el trasplantament de pàncrees, el trasplantament d'illots és un procediment menys invasiu que evita les complicacions quirúrgiques associades amb el trasplantament de pàncrees i pot arribar a permetre la seva realització ambulatoria i facilitar que es puguin realitzar diferents trasplantaments en un mateix receptor. L'objectiu a llarg termini seria eliminar la necessitat d'utilitzar tractament immunosupressor i per això s'estan estudiant diferents estratègies com l'encapsulació dels illots o la modificació de les característiques immunogèniques dels illots trasplantats. Evitant el risc que suposa utilitzar immunosupressors seria acceptable el trasplantament en les fases inicials de la malaltia abans de l'aparició de les complicacions (231,371).

5.3.2. Trasplantament en humans: estat actual del trasplantament

El trasplantament d'illots pancreàtics es va començar a conèixer com a tractament de la diabetis a principis dels anys 70 quan Lacy i els seus col·laboradors van demostrar que la hiperglicèmia a ratolins diabètics podia ser tractada mitjançant el trasplantament d'illots (24). Al llarg dels anys 70 i 80 diferents intents d'aplicar aquest tractament en humans no van tenir un resultat positiu. Als anys 90 van aparèixer alguns estudis exitosos, en els quals alguns receptors de trasplantament d'illots es van mantenir sense tractament amb insulina més d'un any després del trasplantament (356). Tot i així el Registre de

Trasplantament d'illots informava al 2000 que només el 12% dels trasplantaments d'illots aconseguien la insulino-independència en algun moment i que només el 8% entre els anys 1990-1999 van mantenir-la durant més d'un any (371). Però el fet que curar la DM-1 era possible va semblar més proper l'estiu del 2000 en que Shapiro i els seus col·laboradors a Edmonton van publicar que el 100% dels 7 pacients diabètics tipus 1 que havien rebut diferents preparacions d'illots pancreàtics es van mantenir insulino-independents durant un any (308). L'estudi d'Edmonton va continuar i recentment s'ha publicat el seguiment dels 17 pacients tractats fins al moment. Tots ells van aconseguir la insulino-independència, dels 15 pacients amb al menys 1 any de seguiment des del primer trasplantament, el 80% (12/15) van mantenir la insulino-independència durant un any i d'aquests 4 de 6 pacients durant més de 2 anys (296).

La clau d'aquest èxit es va basar en el trasplantament de gran nombre d'illots després de l'extracció del pàncrees dels donants i a una modificació important en l'immunosupressió convencional. El nombre d'illots que va rebre cada pacient va ser del voltant de 800.000 illots, un nombre superior al esperable en principi per obtenir la normoglicèmia, ja que l'autotrasplantament de només 300.000 illots està associat amb un 75% d'insulino-independència (344a). Tot i que molt possiblement el nombre d'illots necessaris per mantenir la normoglicèmia és inferior, ja que en l'autotrasplantament es produeixen pèrdues inicials d'illots degut a processos d'inflamació no-específica que tenen lloc tant en al·lotrasplantaments com en autotrasplantaments. Per tant possiblement en l'estudi d'Edmonton va ser necessària aquesta massa beta superior per tal de superar les pèrdues inicials d'illots després del trasplantament degudes als processos de rebuig, autoimmunitat i inflamació no-específica. Les modificacions en la immunosupressió van ser l'eliminació dels glucocorticoids, utilitzant una dosi baixa de tacrolimus, l'habitual dosi de rapamicina (sirolimus) i afegint un anticòs anti-receptor IL-2 (daclizumab). Es coneixia que els glucocorticoids i el tacrolimus afectaven la funció i la supervivència de la cèl·lula beta. És probable que aquestes dues drogues i la ciclosporina conduïssin al fracàs dels trasplantament d'illots, especialment perquè es concentren principalment al fetge

després de l'administració oral, lloc on els illots eren trasplantats mitjançant embolització portal subcutània.

5.3.3. Massa beta i trasplantament

La limitada disponibilitat d'òrgans és un problema molt seriós i és un factor limitant a l'hora de realitzar trasplantament d'illots. Existeix una gran desproporció entre el número de donants i els receptors potencials. A Espanya on la taxa de donació d'òrgans és la més alta del món el número de donacions és de 1,350 per any, però seria impossible fer front al trasplantament dels 100,000 pacients de tipus 1 que existeixen (231). Aquesta desproporció encara és més greu si es considera que actualment es necessita més d'un pàncrees per obtenir suficients illots per trasplantar un únic pacient.

Una altra de les dificultats del procés és la pèrdua d'illots abans i després del trasplantament. Les pèrdues d'illots després del trasplantament comportarien que sigui necessari un major número d'illots a trasplantar per aconseguir la normoglicèmia. Per tant les pèrdues d'illots es poden dividir en factors que afecten l'aïllament d'illots i factors relacionats amb el mateix procediment de trasplantament. Una de les limitacions és el procés d'aïllament d'illots pancreàtics. Els primers mètodes eren mecànics i no permetien recuperar un número adequat d'illots. La descripció per Ricordi al 1988 (286) d'un mètode semiautomàtic d'aïllament va suposar un gran avanç i va permetre la realització dels primers trasplantaments amb èxit dels anys 90. Per altra banda la substitució de la col·lagenasa per la liberasa com a enzim utilitzat en la digestió del pàncrees ha augmentat el rendiment i la reproductibilitat de l'aïllament i ha millorat la preservació dels illots (183). El grup d'Edmonton van utilitzar 2-3 pàncrees per pacient per aconseguir trasplantar 800.000 illots (9000 IE/Kg) (308) i un pàncrees sa té com a mitja un milió d'illots. Per tant el número d'illots que s'obtenen en el procés d'aïllament és encara inferior al que conté el pàncrees del donant. A més el fet que el procés no estigui del tot automatitzat confereix al procés un component artesanal que condueix a una important

variabilitat en els resultats finals de l'aïllament, tant en número, puresa i qualitat dels illots.

En l'aïllament dels illots és important la utilització de reactius amb una activitat endotoxina baixa. S'ha descrit que l'endotoxina que pot estar present en l'enzim utilitzat per la digestió dels illots en models animals, col·lagenasa P, pot alterar l'implantació de l'empelt d'illots (82), activar l'expressió de citocines (147,148,351) i provocar la pèrdua de funció dels illots activant la producció de NO (328,351). Dos mecanismes sinèrgics poden estar actuant:

- 1) L'endotoxina indueix la producció de citocines proinflamatòries per part dels macròfags residents de l'illot i activa cèl·lules endotelials millorant la migració de monòcits i cèl·lules polimorfonuclears, expandint la resposta inflamatòria local.
- 2) Aquestes citocines presents als illots poden activar a la vegada macròfags residents als illots a produir més citocines i NO, contribuint a la inducció de la inflamació local.

A més en relació als factors que afecten l'aïllament dels illots hi ha un important debat sobre si la puresa de les preparacions d'illots és necessària (120). El contingut d'insulina total d'una preparació d'illots cau dramàticament després de la purificació d'illots (43). Però per altra banda la infusió de grans quantitats de teixit acinar contaminant a autoempelts d'illots s'ha associat a diferents complicacions com hipertensió portal (217,354). També s'ha suggerit que a illots completament purificats s'indueix l'activació de l'apoptosi (108), ja que el teixit exocrí exerceix influències tròfiques sobre les cèl·lules beta (288,345) i que seria més adequat trasplantar illots units a teixit acinar.

Per altra banda les pèrdues d'illots després del trasplantament poden ser degudes a tres fenòmens:

1) Rebuig agut de l'empelt al·logènic

El fracàs de l'empelt al·logènic d'illots es considera que es degut en part a la destrucció de les cèl·lules de l'illot mitjançada pel sistema immune (305,287). Els antígens

de l'empelt són processats per les cèl·lules presentadores d'antigen (APCs) de l'hoste i presentats a les cèl·lules T CD4⁺. A més si la injecció dels illots és intraportal la presència de macròfags pot conduir a l'alliberament de citocines que poden contribuir al procés de rebuig. En conjunt diferents citocines inflamatòries són secretades com IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-10 i IFN γ (250,75), les quals podrien explicar el rebuig ràpid dels empelts al·logènics d'illots.

2) Reparició de l'autoimmunitat

Diferents dades han suggerit la recurrència de la insulitis autoimmune tant a empelts al·logènics d'illots com pancreàtics. A dos pacients que havien patit rebuig dels empelts pancreàtics implantats es va observar una destrucció selectiva de cèl·lules beta malgrat la immunosupressió i un dels quals va generar anticossos contra cèl·lules de l'illot (ICAs) i anticossos GAD65 després del trasplantament (349). A la vegada un altre grup va demostrar la destrucció també de cèl·lules beta amb presència d'infiltrat limfocitari a individus que havien rebut un trasplantament d'illots amb tractament immunosupressor (325).

La recurrència de la diabetis després del trasplantament de pàncrees és també ben coneguda en bessons amb idèntics HLA. Després de 6-12 setmanes del trasplantament 3 de 4 pacients estudiats presentaven una alteració en la funció de l'empelt. Les biòpsies d'aquests empelts mostraven un procés inflamatori amb un infiltrat de cèl·lules mononuclears i una destrucció selectiva de cèl·lules beta, demostrant la destrucció selectiva de les cèl·lules beta com a conseqüència de la recurrència de l'autoimmunitat (314).

Diferents estratègies s'han desenvolupat per modular la resposta immune i evitar l'aparició de la diabetis, les quals podrien ser útils per intentar evitar la pèrdua de les cèl·lules beta degut a la reparició de l'autoimmunitat. El NO es coneix que es produeix davant l'exposició a citocines i que en part és responsable del dany que condueix a la destrucció de les cèl·lules beta en la diabetis. Estudis recents han mostrat que inhibidors de iNOS poden parcialment protegir contra la insulitis (71). També una altra estratègia per

protegir els empelts ha estat la manipulació de la proteïna Fas (172). Quan cèl·lules T que expressen a la seva superfície Fas entren en contacte amb altres cèl·lules T que expressen el seu lligand s'activarà la mort per apoptosi d'aquestes cèl·lules. Per tant l'expressió del lligand de Fas en cèl·lules beta pot protegir els illots davant una destrucció autoreactiva per part de les cèl·lules T que expressen Fas, ja que d'aquesta manera s'activarà la mort de les cèl·lules T.

3) No funció primària (primary nonfunction, PNF)

La situació en què un empelt fracassa i no arriba a ser funcional es coneix com no funció primària. Aquesta pèrdua primerenca de l'empelt sovint està associada a una funcionalitat pobra del teixit trasplantat a més de la presència d'un fenomen d'inflamació no específic (29). Aquest fet també s'ha descrit a trasplantament d'illots singènics (237) i a models on les cèl·lules T es trobaven inactivades (53,159), suggerint que altres mecanismes diferents que els processos de rebuig i autoimmunitat estan involucrats en aquest fenomen. En l'autotrasplantament d'illots en animals d'experimentació s'ha vist descrit una pèrdua de funció dels illots autotrasplantats, la qual cosa confirma que factors no immunològics són també importants per a la supervivència dels illots trasplantats (4).

Diferents mecanismes no-específics poden participar en la pèrdua inicial de l'empelt com la manca de vascularització de l'empelt en els primers dies després del trasplantament o l'exposició a un microambient no favorable en el lloc d'implantació de l'empelt que provoca una inflamació no-específica (29). Les cèl·lules de l'illot requereixen més del 10 % del flux sanguini del pàncrees (181), però després de l'aïllament el flux sanguini als illots queda interromput i a més a més l'endoteli vascular no sobreviu més de 2-3 dies (252). Els illots dependran de la difusió d'oxigen i nutrients de la perifèria fins que el procés de revascularització no es completi al voltant del dia deu després del trasplantament (222), però de tota manera pocs nous vasos penetraran en les cèl·lules de l'illot trasplantades. Per tant en el període posterior al trasplantament no hi ha dubte que les cèl·lules de l'illot són molt més vulnerables i pateixen hipòxia. Hipòxia que pot conduir a la mort de cèl·lules de l'empelt d'illots (69). Els empelts d'illots a més poden presentar cèl·lules mortes provinents del procés d'aïllament que junt amb les que moren

per manca de vascularització poden amplificar aquest procés inflamatori. Procés inflamatori que provocarà problemes funcionals i destrucció de les cèl·lules de l'illot.

El paper dels macròfags en el PNF s'ha demostrat en diferents estudis en què la supervivència de l'empelt augmentava amb el tractament amb diferents agents que inactivaven o reduïen els macròfags com el gadolinium, el clodronat o la 15-deoxispergualina a models de rosegadors i canins de trasplantament d'illots (42,161,327).

Com hem comentat anteriorment una de les dificultats del trasplantament d'illots és la obtenció de suficient massa de teixit insular pel trasplantament. Una massa crítica d'illots més gran que la que es podria preveure (361) ha de ser trasplantada per aconseguir la normoglicèmia. L'èxit del trasplantament dependrà d'aquest nombre inicial d'illots trasplantats (158,357,358). Tant una limitació de la capacitat de creixement dels illots trasplantats en comparació amb els illots pancreàtics endògens o un augment de la mort cel·lular que superi la capacitat de creixement poden conduir a una pèrdua continua de la massa cel·lular beta i al fracàs de l'empelt.

La pèrdua d'illots durant el trasplantament, la falta d'implantació dels illots, l'anòxia i la mort cel·lular als illots en els primers dies després del trasplantament poden ser algunes de les causes de la disminució de la massa beta final i que contribueixin al fracàs primari del trasplantament. Aquesta mort cel·lular beta pot ser deguda a un procés immunològic com el rebuig o la reparació de l'autoimmunitat o a un procés no immunològic com una inflamació no-específica en el lloc d'implantació dels illots. Aquesta inflamació no-específica es pot produir en els dies posteriors al trasplantament degut a la manca de vascularització dels illots o a l'exposició a un microambient no favorable amb presència de productes citotòxics com citocines i NO. No es coneix si les condicions metabòliques del receptor podrien jugar algun paper en aquesta pèrdua no-immunològica al llarg del trasplantament. Per tant aquesta pèrdua de massa beta comporta que sigui necessari trasplantar més illots i de millor qualitat. Però degut al problema de l'escassa disponibilitat de teixit insular a trasplantar seria necessari millorar el rendiment de l'aïllament o tractar d'evitar la destrucció dels illots després del trasplantament.

Per tant seria essencial identificar els factors i els mecanismes que contribueixen a la pèrdua inicial dels illots per tal de dissenyar estratègies que puguin reduir-la, fet que conduirà a una reducció de la massa beta a trasplantar i a una millora del pronòstic del trasplantament.

OBJECTIUS

La hipòtesi de l'estudi és que en els primers dies després del trasplantament es produeix una pèrdua important de cèl·lules beta que contribueix a elevar la massa beta requerida per a obtenir la normoglicèmia. La pèrdua de teixit trasplantat podria ser deguda a un procés d'inflamació no-específica i les condicions metabòliques del receptor podrien modular la pèrdua de massa beta tant en els primers dies després del trasplantament com a llarg termini.

L'objectiu general és l'estudi dels fenòmens que tenen lloc en els primers dies després del trasplantament, i específicament els mecanismes de mort dels illots trasplantats, els fenòmens inflamatoris que es produeixen al lloc d'implantació dels illots i la possible contribució de l'estat metabòlic del receptor.

Els objectius concrets de l'estudi són determinar en els primers dies després del trasplantament,

- 1) si hi ha un augment en la mort cel·lular i quins són els mecanismes involucrats en aquesta mort cel·lular
- 2) la pèrdua de la massa cel·lular beta trasplantada i la contribució dels diferents mecanismes de mort cel·lular
- 3) el paper de la replicació i la hipertròfia en la pèrdua o manteniment de la massa beta trasplantada
- 4) si les condicions metabòliques del receptor poden modificar la mort cel·lular i la massa beta trasplantada, per tal de reduir la massa beta inicialment trasplantada
- 5) si hi ha un augment en l'expressió de IL-1 β a illots singènics trasplantats i si existeixen diferències en l'expressió de IL-1 β a receptors diabètics hiperglicèmics i normoglicèmics tractats amb insulina
- 6) l'expressió de iNOS a illots singènics trasplantats i si existeixen diferències en l'expressió de iNOS a receptors diabètics hiperglicèmics i normoglicèmics tractats amb insulina

MATERIAL I MÈTODES

6. Animals d'experimentació

L'estudi de la lesió de les cèl·lules beta trasplantades es va realitzar en un model d'hiperglicèmia crònica en ratolins singènics C57Bl/6 mascles d'entre 8 i 12 setmanes (B&K Universal, Regne Unit) ben establert en el nostre grup. Per altra banda per qüestions tècniques derivades del nombre d'illots necessaris per realitzar l'estudi d'expressió gènica es va reproduir el model en rates Lewis mascles d'entre 7 i 10 setmanes (B&K Universal, Regne Unit) per tal de poder disposar del número d'illots trasplantats suficients per realitzar els diferents experiments.

6.1. Inducció de la Diabetis

Els receptors del trasplantament van rebre una injecció intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (Sigma Immunochemicals, USA) de 180 mg/kg de pes els ratolins i de 65 mg/kg les rates dissolta en tampó citrat (pH=4.5) per fer-los diabètics. La diabetis va ser confirmada abans del trasplantament per la presència d'hiperglicèmia, pèrdua de pes i poliúria. Únicament van ser trasplantats els animals amb nivells de glicèmia superiors a 20 mmol/l en dues mesures consecutives.

6.2. Tractament amb insulina

Els animals que van rebre tractament amb insulina van ser tractats amb implants d'alliberament sostingut d'insulina. Els implants consisteixen en una barreja d'insulina bovina i àcid palmític microcristal·litzat i alliberen una dosi basal d'insulina constant durant uns 60 dies. Els ratolins van rebre dos implants Linbit™ i les rates un implant Linplant® (Linshin Canada, Inc.; Canada). Els implants Linbit™ alliberen al voltant de 0.1 U Insulina/24 h/implant i els implants Linplant® al voltant de 2 U Insulina/24 h/implant.

La col·locació dels implants es va realitzar sota anestèsia amb èter de forma subcutània en la zona cervical realitzant una petita incisió a la pell. Acabat el tractament els implants va ser retirats sota anestèsia.

El tractament d'insulina es va iniciar 7 dies abans del trasplantament i es va realitzar el trasplantament després d'un mínim de 48 h de normoglicèmia (nivells de glucosa per sota 8.3 mmol/l). El tractament es va retirar 10 dies en els ratolins o 14 dies en les rates després del trasplantament.

7. Aïllament d'illots pancreàtics

Els illots van ser aïllats per digestió amb col·lagenasa P (Boehringer Mannheim Biochemicals, Alemanya). Els experiments d'expressió gènica es van realitzar utilitzant el mateix lot de col·lagenasa, per evitar les diferències en l'activitat endotoxina presents en diferents lots de l'enzim. Sota anestèsia amb pentobarbital sòdic (Abbott Laboratories, Madrid), 30 mg/kg intraperitoneal, es va realitzar una laparotomia mitja i es va exposar el pàncrees de l'animal. Es va lligar el colèdoc pancreàtic a nivell de l'ampolla de Vater i es va canular distalment amb una agulla de 30_{1/2} G en el cas dels ratolins o amb un tub de plàstic flexible en el cas de les rates injectant la solució de col·lagenasa dissolta a una concentració de 2 mg/ml de medi de cultiu M-199 (infusió de 2 ml en el cas dels ratolins i 7 ml en el de les rates). L'animal va ser sacrificat i el pàncrees disseccionat de la resta de teixits i incubat a 37°C en un bany durant uns 11 min. en el cas del ratolí i 23 min. en el cas de la rata. Després es van realitzar tres rentats del digerit amb medi M-199 i es van passar per un filtre de 400 µm per eliminar els restes de teixit no digerit. Els illots van ser separats en un gradient de densitat utilitzant Histopaque 1077 (Sigma) i centrifugant-lo a 2300 rpm durant 15 min. a 4°C. Es van recuperar els illots de la interfase i es van rentar tres vegades amb medi M-199 suplementat amb un 10% de sèrum de vedella fetal (Gibco Brl., Alemanya).

Els illots aïllats van ser pescats a mà sota un estereomicroscopi 2 o 3 vegades fins l'obtenció d'una població pura d'illots. Només els illots d'un diàmetre inferior a 200 µm

van ser recollits pel seu posterior trasplantament per intentar homogeneïtzar les mostres d'illots en l'estudi fet amb el model de ratolí.

Després de l'aïllament els illots es varen utilitzar per fixar-los directament fent grups d'illots que anomenarem pellets, per trasplantar i per realitzar extraccions de RNA d'illots frescos.

8. Grups experimentals

Animals diabètics varen ser trasplantats amb una massa beta insuficient per restablir la normoglicèmia. Per tant els animals es mantindrien hiperglicèmics al llarg de l'estudi. Per tal de poder tenir un grup hiperglicèmic i un normoglicèmic trasplantant la mateixa quantitat de massa beta en els dos grups, un grup va ser tractat amb insulina i posteriorment va ser trasplantat mantenint el tractament amb insulina. Per tant aquests animals van presentar uns nivells baixos de glicèmia durant l'estudi. Els animals diabètics van ser distribuïts a l'atzar entre els diferents grups després del trasplantament.

Els ratolins C57Bl/6 van ser trasplantats amb 100 illots singènics que són una massa cel·lular beta insuficient per restablir la normoglicèmia en aquest model (223). Després de 7-14 dies de la injecció amb STZ, els grups 1 (n=7), 2 (n=9) i 3 (n=13) van ser trasplantats i els grups 4 (n=8), 5 (n=10) i 6 (n=7) van començar el tractament amb insulina i van ser trasplantats després d'una setmana de tractament quan ja havien recuperat la normoglicèmia. Els empelts de ratolí van ser extrets al dia 3 (grups 1 i 3), 10 (grups 2 i 5) o 30 (grups 3 i 6) després del trasplantament (Fig.16.).

Un grup control d'animals normals no trasplantats (n=6) van rebre un seguiment setmanal de nivells de glucosa i pes.

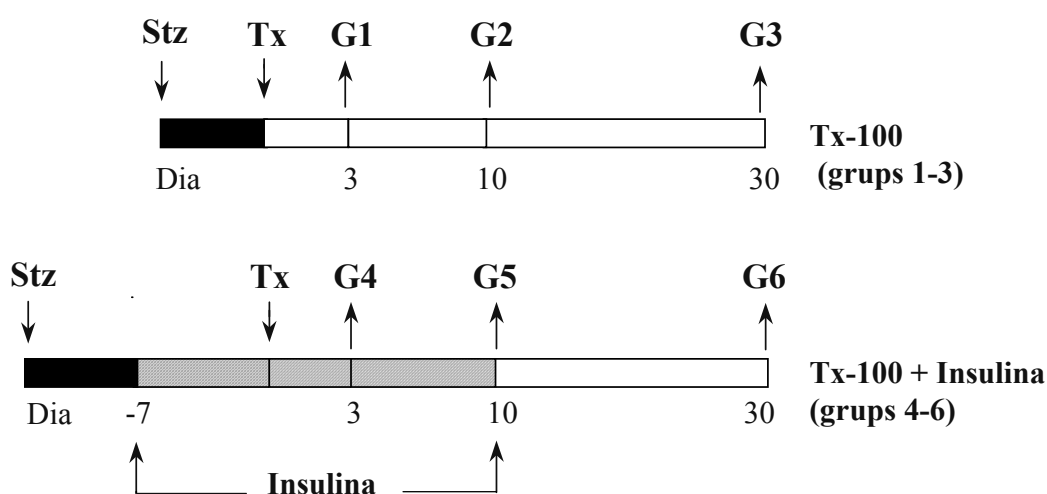


Fig.16. Disseny experimental en el model de ratolí. Stz: dia de la injecció amb estreptozotocina. Tx: dia del trasplantament. G1-6 són els grups experimentals descrits anteriorment. Tx-100: correspon al grup trasplantat amb 100 illots, Tx-100 + Insulina: correspon al grup tractat amb insulina i trasplantat amb 100 illots.

En els experiments de mRNA d'illots trasplantats es va utilitzar un model de rata per obtenir prou mostra per poder realitzar l'estudi. Per tal de reproduir el model de ratolí en rata es va trasplantar igualment una massa beta insuficient per restablir la normoglicèmia. Es va demostrar prèviament que el tractament amb insulina permetia normalitzar els nivells de glicèmia amb els implants d'insulina específics per les rates. Així es va disposar d'un grup hiperglicèmic i un normoglicèmic mitjançant el tractament amb insulina.

Les rates Lewis van ser trasplantades amb 500 illots singènics que són una massa beta insuficient per restablir la normoglicèmia en el model de rata (27,165,348). Els animals van iniciar el tractament amb insulina o van ser trasplantats després de 12-14 dies de la injecció amb STZ per evitar la regeneració del pàncrees endogen. Després d'aquests dies, els grups 1 (n=5), 2 (n=9) i 3 (n=5) van ser trasplantats i els grups 4 (n=4), 5 (n=9) i 6 (n=4) van començar el tractament amb insulina. Els empelts de rata van ser extrets al dia 1 (grups 1 i 4), 3 (grups 2 i 5) i 7 (grups 3 i 6) després del trasplantament (Fig.17.). Prèviament es van realitzar uns experiments preliminars, per comprovar que el manteniment de la normoglicèmia tenia un efecte beneficiós sobre les cèl·lules beta trasplantades, trasplantant dos grups d'animals amb 500 illots, un grup va rebre tractament

amb insulina (n=6) i un altre no va ser tractat (n=3). Els empelts van ser extrets 28 dies després del trasplantament. Alguns animals van mantenir-se 42 dies després del trasplantament per confirmar la restauració de la normoglicèmia. Uns empelts van ser fixats per la posterior inclusió amb parafina i uns altres van ser utilitzats per l'extracció de RNA.

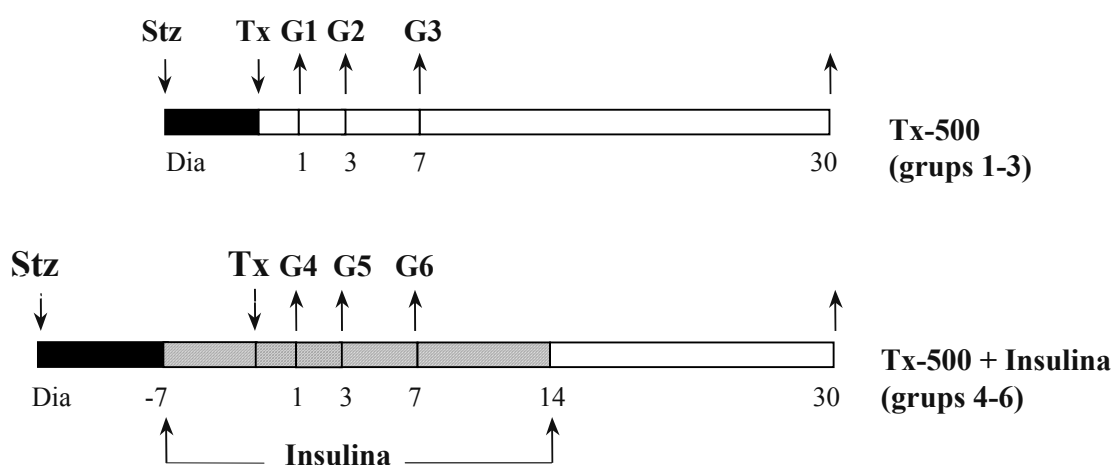


Fig.17. Disseny experimental en el model de rata. Stz: dia de la injecció amb estreptozotocina. Tx: dia del trasplantament. G1-6 són els grups experimentals descrits anteriorment. Tx-500: correspon al grup trasplantat amb 500 illots, Tx-500 + Insulina: correspon al grup tractat amb insulina i trasplantat amb 500 illots.

9. Trasplantament d'illots pancreàtics

Grups de 100 illots de ratolí i grups de 500 illots de rata van ser comptats i recollits amb una punta de pipeta de 200 µl, es van deixar sedimentar i es van passar a un tub de polietilè PE-50 (Smiths Industries, Regne Unit) amb l'ajuda d'una xeringa Hamilton de 1 ml (Hamilton Company, USA). El tub es va centrifugar a 600 rpm durant 1 min. per agrupar els illots prèviament al trasplantament.

Sota anestèsia dels receptors amb èter en el cas dels ratolins i amb talamonal (5 mg/kg droperidol i 0.1 mg/kg fentanil via intraperitoneal) en el cas de les rates es va

realitzar una incisió lumbar i es va exposar el ronyó esquerre on es va fer una capsulectomia en el pol inferior per poder introduir el tub amb els illots. Amb l'ajuda d'una xeringa Hamilton es van injectar els illots en el pol superior del ronyó. La capsulectomia va ser tancada amb un cauteritzador de baixa temperatura (AB Medica, S.A., Barcelona) i la ferida lumbar suturada després del trasplantament.

10. Extracció dels empelts en els diferents grups experimentals

Un cop anestesiats l'animal, el ronyó va ser exposat i la càpsula renal que envolta l'empelt va ser retallada i extreta amb l'empelt. Els illots es troben poc adherits a la càpsula renal immediatament després del trasplantament impeding una extracció completa de tot el teixit trasplantat, però 3 dies després del trasplantament els empelts són suficientment compactes per assegurar la completa recuperació del teixit trasplantat. L'extracció es va realitzar sota microscopi i després de l'extracció de l'empelt el còrtex renal va ser examinat per assegurar que no quedaven restes de teixit insular. Finalment es va realitzar una nefrectomia esquerra per assegurar la total extracció del teixit insular trasplantat i es va suturar la incisió. Immediatament després de l'extracció dels empelts es van fixar en paraformaldehid tamponat amb PBS al 4% (PFA) durant 24 h. en el cas de les peces destinades als estudis immunohistoquímics, es van rentar en una solució de sacarosa al 30% en PBS i van ser processades per la posterior inclusió en parafina. En el cas dels empelts destinats a l'estudi de l'expressió gènica els empelts van ser submergits immediatament en la solució de lisi per procedir a realitzar l'extracció del RNA.

El pes de l'empelt es va determinar eliminant tot excés de fixador per capilaritat i pesant-lo en una balança Mettler tipus A240 (Mettler Instruments Corporation, USA) que pesava fins 0.01 mg.

11. Mesura del pes i la glicèmia

Els nivells de la glicèmia i el pes van ser mesurats entre les 9 i les 11 del matí en condicions de no-dejú. La sang va ser obtinguda de la cua dels animals i recollida amb microcapil·lars heparinitzats. Posteriorment els nivells de glucosa van ser mesurats amb lectors de glicèmia portàtils (Accutrend Sensor, Boehringer Mannheim en el cas dels ratolins i Gluocard, Menarini Diagnostics en el cas de les rates). Els animals van ser mantinguts en condicions convencionals en habitacions climatitzades amb lliure accés a aigua corrent i menjar estàndard.

12. Determinació dels nivells d'àcids grassos lliures en plasma

El contingut d'àcids grassos lliures (AGLs) fou determinat en plasma de ratolins control (n=6), ratolins diabètics per STZ (n=4), ratolins trasplantats 30 dies després del trasplantament (n=4) i un grup control de ratolins amb dejú (n=3). La sang va ser recollida mitjançant una punció cardíaca sota anestèsia amb èter en tubs amb EDTA. Posteriorment la sang va ser centrifugada 10 min. a 3500 rpm per separar el plasma i les mostres es van conservar a -20°C. Per la determinació del contingut d'àcids grassos lliures es va realitzar un assaig enzimàtic colorimètric utilitzant un kit comercial (Free Fatty Acids: Half-micro test^R, Roche, Alemanya).

13. Immunohistoquímica

Es van utilitzar talls de 2 µm tant per la tinció de pàncrees, empelts i pellets.

13.1. Quantificació de la mort de les cèl·lules beta

Per determinar la mort per apoptosi es van utilitzar dos mètodes diferents: la tècnica del TUNEL i una tinció amb iodur de propidi. La tècnica del TUNEL comentada anteriorment en l'apartat 3.4. de mètodes de detecció de la mort cel·lular es basa en la fragmentació del DNA. El iodur de propidi és un colorant que s'uneix als àcids nucleics i

permet la detecció de nuclis condensats i fragmentats característics de les cèl·lules apoptòtiques.

13.1.1. Quantificació de la mort de cèl·lules beta per apoptosi

13.1.1.1. Tinció per la tècnica del TUNEL

Els talls van ser doblement tenyits amb immunoperoxidasa per detectar els nuclis apoptòtics mitjançant la tècnica del TUNEL utilitzant un kit comercial (In Situ Cell Death Detection Kit, ApopTag®, Intergen) i per fosfatasa alcalina per detectar les cèl·lules endocrines no beta dels illots. El mètode del TUNEL es basa en la transferència de nucleòtids marcats amb digoxigenina als extrems 3'OH de talls presents en el DNA catalitzada per l'enzim desoxinucleotidil transferasa. Els nuclis tenyits van ser detectats utilitzant un anticòs anti-digoxigenina conjugat amb peroxidasa. Per la reacció de la peroxidasa es va utilitzar com a substrat 3,3-diaminobenzimida tetrahydroclorur (DAB) i peròxid d'hidrogen. La tinció pel TUNEL es va realitzar seguint les instruccions del kit. Posteriorment, les preparacions van ser rentades amb aigua destil·lada i incubades amb una solució d'àcid acètic al 15% durant 15 min. per la inhibició de l'activitat fosfatasa alcalina endògena. Després les preparacions van ser incubades amb una solució de PBS i sèrum de xai al 5% (Gibson BRL), rentades en una solució de PBS i Tween al 0.2% (Boira, USA) i seguidament van ser incubades amb un còctel d'anticossos (Dako, Dinamarca): anticòs de conill anti-glucagó (dilució final utilitzada 1:1000), anticòs de conill anti-somatostatina (dilució final 1:1000) i anticòs de conill anti-polipèptid pancreàtic (dilució final 1:500). Després de la incubació amb els anticossos primaris durant tota la nit a 4°C, les seccions es van rentar amb una solució de PBS i Tween 0.05% i posteriorment amb una solució Tris-HCl (pH=8.2). Seguidament es van incubar amb un anticòs anti-fosfatasa alcalina de conill (Sigma) (dilució final 1:50) i es van tenyir utilitzant com a substrat 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfatasa/nitroblue tetrazolium liquid (Sigma) durant aproximadament 45 min. La contratinció de les seccions es va realitzar amb Hematoxilina

de Mayer (Sigma) i es van muntar amb un medi de muntatge d'aquós Aquatex (Merck, Alemanya).

Es van tenyir les cèl·lules endocrines no beta en lloc de les cèl·lules beta perquè la condició d'hiperglicèmia severa, esperada en els grups no tractats amb insulina, està associada a una degranulació de les cèl·lules beta que dona lloc a una tinció per insulina negativa o molt dèbil. A més a més s'havia observat un contingut d'insulina més baix en els empelts durant el tractament amb insulina, el qual podia provocar una reducció del marcatge per insulina en els grups 4 i 5. Finalment la tinció doble del citosol i el nucli d'una mateixa cèl·lula pot ser difícil de discernir. Seccions d'empelts del grup 6 corresponents a animals normoglicèmics i de pàncrees de ratolins controls van ser tenyits per doble immunohistoquímica amb TUNEL i un anticòs anti-insulina de porc procedent de conill d'Índies (Dako) (dilució final 1:500) per validar el mètode de tinció només de cèl·lules endocrines no beta. Els resultats van ser comparats amb els obtinguts mitjançant la tinció de cèl·lules endocrines no beta.

Les cèl·lules beta i els nuclis apoptòtics es van comptar utilitzant un microscopi Olympus BH2 connectat a una càmera de vídeo amb un monitor en color. A l'hora de comptar els nuclis apoptòtics es van excloure les àrees de necrosi on es podien tenir falsos positius degut a l'important soroll de fons que incorporen aquestes àrees amb restes cel·lulars. L'apoptosi de cèl·lules beta es va expressar com a percentatge de cèl·lules beta positives per la tècnica del TUNEL. Es van comptar un mínim de 1000 cèl·lules per empelt. Totes les cèl·lules endocrines de cada secció van ser comptades i quan es va requerir es van incloure més seccions.

L'apoptosi de cèl·lules beta dels illots abans del trasplantament es va determinar en sis grups de 100 illots de ratolí i de rata aïllats en diferents dies d'aïllament. Després de l'aïllament, els illots es van rentar amb PBS i es van fixar pellets d'illots amb una solució de PFA al 4%. Seccions de pellets d'illots van ser doblement tenyits pel TUNEL i per les cèl·lules endocrines no beta com s'ha descrit anteriorment. A més a més l'apoptosi de cèl·lules beta en pàncrees normals es va determinar en cinc pàncrees d'animals control.

Seccions de pàncrees van ser doblement tenyides i comptades com s'ha descrit anteriorment pels empelts i els illots aïllats.

13.1.1.2. Tinció per iodur de propidi

La tinció amb iodur de propidi permet la detecció de nuclis condensats i fragmentats característics de cèl·lules apoptòtiques. Es van tenyir seccions d'empelts per les cèl·lules endocrines beta amb un anticòs anti-insulina durant 48 h. a 4°C i un anticòs anti-IgG de conill es va utilitzar com a anticòs secundari. Finalment després de la incubació amb un anticòs terciari amb peroxidasa conjugada es van revelar les seccions utilitzant com a substrat DAB. Posteriorment es van rentar amb aigua destil·lada, PBS i es van incubar amb una solució de IP (Sigma) 100 µg/ml i RNAasa (Sigma) 100 µg/ml durant 30 min. a 37°C. Després d'uns rentats amb PBS les seccions van ser muntades amb el medi de fluorescència Fluoroprep (Dako). El teixit insular tenyit per la insulina es va comptar utilitzant el camp clar del microscopi i les cèl·lules apoptòtiques van ser examinades sota la llum de fluorescència utilitzant un filtre per la rodamina. Els resultats es van expressar com a percentatge de les cèl·lules apoptòtiques per les cèl·lules beta totals.

13.1.2. Quantificació de l'àrea insular necròtica

La mesura de les àrees de necrosi es va realitzar per morfometria per comptatge de punts a les mateixes seccions on es va quantificar la massa de cèl·lules beta. Les seccions visualitzades al monitor van ser cobertes per una plantilla de 48 punts per poder comptar el número de punts sobre cèl·lules beta, no beta i teixit no endocrí. Es va comptar un número de punts suficient perquè el error estàndard relatiu fos inferior al 10% i tenir així una mostra representativa (360a). L'àrea necròtica es va expressar com a percentatge dels punts sobre teixit necròtic dividit pels punts sobre teixit insular (cèl·lules beta i no beta) i necròtic.

13.2. Quantificació de la replicació de cèl·lules beta

13.2.1. Tinció per BrdU

Per determinar la replicació de cèl·lules beta, els animals van ser injectats 6 h. abans de l'extracció de l'empelt amb l'anàleg de la timidina, 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (Sigma) 100 mg/kg pes intraperitonealment. La BrdU s'incorpora al DNA d'aquelles cèl·lules que es troben a la fase S del cicle cel·lular. Els talls van ser tenyits doblement amb immunoperoxidasa, per detectar la BrdU i les cèl·lules endocrines no beta dels illots. Per tenyir les cèl·lules per a la BrdU, s'utilitzà un anticòs monoclonal anti-BrdU, i un anticòs secundari anti-IgG2A. La tinció de cèl·lules endocrines no beta es portà a terme mitjançant el còctel d'anticossos i un anticòs secundari anti-IgG. Les cèl·lules positives per a BrdU es distingeixen pel seu nucli tenyit de gris i les cèl·lules endocrines no beta tenen el citoplasma tenyit de marró més clar.

Abans de la incubació amb l'anticòs anti-BrdU, les seccions van ser pretractades amb una solució HCl 3M durant 20 min., rentades amb una solució Borax 0.1 M durant 10 min. i incubades amb tripsina 0.5 mg/ml durant 5 min. a temperatura ambient. Les seccions van ser tenyides per la BrdU utilitzant un kit comercial, Cell Proliferation Kit (Amersham, Regne Unit). Les seccions es van incubar amb un anticòs monoclonal anti-BrdU de ratolí diluït amb una solució que conté nucleasa per la desnaturalització del DNA durant 1 hora a temperatura ambient. Posteriorment es van rentar amb una solució de PBS amb tritó X-100 (Sigma) al 0.2% i es van incubar amb un anticòs secundari anti-IgG2a de ratolí unit a peroxidasa (PAP). Les seccions es van incubar amb una solució amb DAB més un intensificador que contenia peròxid d'hidrogen, clorur de níquel i cobalt. Després les seccions van ser rentades amb una solució de HCl 0.01 mM i amb aigua corrent, incubades amb una solució de PBS i sèrum de xai al 5% i finalment tenyides per les cèl·lules endocrines no beta utilitzant el còctel d'anticossos descrit prèviament. Les seccions es van tenyir amb aquest còctel durant tota la nit a 4°C, es van rentar amb una solució de PBS i es van incubar amb un anticòs secundari IgG anti-conill de cabra. Després de rentar les

seccions amb una solució de Tris (pH=7.4) es van incubar amb un anticòs terciari anti-peroxidasa amb peroxidasa unida i posteriorment amb DAB i peròxid d'hidrogen pel seu revelat.

La replicació de cèl·lules beta va ser expressada com a percentatge de cèl·lules beta positives per la BrdU i un mínim de 1000 cèl·lules van ser comptades per empelt.

La replicació de les cèl·lules beta es va mesurar en cinc pàncrees de ratolins C57Bl/6 normals que havien estat injectats 6 h. abans de l'extracció amb BrdU. Seccions dels pàncrees van ser doblement tenyides per BrdU i cèl·lules endocrines no beta com s'ha descrit prèviament en els empelts i la replicació expressada com a percentatge de cèl·lules beta positives per BrdU.

13.3. Quantificació de l'àrea individual de les cèl·lules beta

L'àrea individual de les cèl·lules beta com una mesura de la mida cel·lular beta es va determinar en seccions d'empelts i illots aïllats tenyits amb immunoperoxidasa utilitzant un programa d'anàlisi d'imatges, AnalySIS 3.0 (Soft Imaging System, Alemanya). L'àrea de les cèl·lules beta trasplantades es va mesurar a les mateixes seccions utilitzades per mesurar la massa, la replicació o l'apoptosi de les cèl·lules beta. L'àrea individual de les cèl·lules beta corresponent al dia del trasplantament es va determinar en seccions de sis grups de 100 illots utilitzats per la mesura la massa de cèl·lules beta trasplantada inicialment. Tant en seccions d'empelts com d'illots aïllats l'àrea corresponent a cèl·lules beta es va delimitar en un camp aleatori d'un monitor d'ordinador connectat al microscopi per excloure altres teixits i es va mesurar l'àrea total de teixit beta en aquest camp. Després es van comptar els nuclis de cèl·lules beta d'aquest camp. Per calcular l'àrea individual de les cèl·lules beta, l'àrea de cèl·lules beta total d'un camp es va dividir pel número de nuclis de cèl·lules beta.

13.4. Quantificació de la massa de les cèl·lules beta

La massa de les cèl·lules beta es va mesurar per morfometria per comptatge de punts en seccions tenyides per immunoperoxidasa on anteriorment havíem comptat l'apoptosi o la replicació de les cèl·lules beta. La massa de les cèl·lules beta es va obtenir multiplicant el pes de l'empelt pel volum relatiu de cèl·lules beta. El volum relatiu de cèl·lules beta correspon al número de punts sobre cèl·lules beta dividit pels punts sobre teixit insular (cèl·lules beta i no beta) i altres teixits no endocrins.

La massa de les cèl·lules beta dels illots el dia del trasplantament es va determinar en 6 grups de 100 illots aïllats en dies diferents. Després de l'aïllament, els illots es van rentar amb PBS i es fan fixar pellets d'illots amb PFA al 4%. L'excés de paraformaldehid es va eliminar per capil·laritat i el pellet va ser pesat, seguint el mateix procediment que amb els empelts. La massa de les cèl·lules beta es va obtenir multiplicant el pes dels illots pel percentatge de volum de les cèl·lules beta, determinat prèviament mitjançant un programa electrònic de planimetria (Sigma Scan 3.9, Jandel, Alemanya) en seccions de pellets d'illots.

14. Anàlisi de RNA per RT-PCR

14.1. Extracció de RNA total

Es va realitzar l'extracció de RNA utilitzant un kit comercial (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Alemanya). El teixit es va homogeneïtzar amb una solució de lisi que contenia β -mercaptoetanol pipetejant 100 vegades amb una pipeta Pasteur de branca llarga. Es va comprovar que d'aquesta manera els illots es desprenien de la càpsula renal sense aquesta digerir-se. Seguidament es va centrifugar l'homogenat per descartar la càpsula no digerida i el sobrenedant es va transferir a una columna amb una membrana de sílica gel on s'uniren

les cadenes de RNA. El RNA es va eluir en aigua-DEPC i es va determinar la concentració i la puresa mesurant l'absorbància a 260 i 280 nm respectivament.

Es va realitzar l'extracció de RNA de 6 grups de 500 illots aïllats en dies diferents. Després de l'aïllament, els illots es van passar a tubs de 1.5 ml amb medi M-199 suplementat amb un 10% de sèrum de vedella fetal, es van centrifugar a 1000 rpm 3 min, es va retirar tot el sobrenedant i es va afegir la solució de lisi i es va seguir el mateix protocol descrit anteriorment.

14.2. Protocol d'amplificació per RT-PCR

A partir del RNA extret d'illots frescos i empelts es va sintetitzar el cDNA seguint el següent protocol. Primerament es va realitzar un tractament amb DNAasa (Promega, USA) per eliminar possibles contaminacions de les mostres amb DNA durant 30 min. a 37°C. Posteriorment es van incubar les mostres amb 500 ng d'encebadors aleatoris (random primers) (Promega) durant 10 min. a 60°C. Després es va afegir una barreja de: 5X First-Strand Buffer (5 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 400 U Superscript II RNase H⁻ Transcriptasa Reversa (Invitrogen, USA), 20U RNAsin (Promega) i 500 µM de cadascun dels dNTPs en un volum final de 40 µl. La reacció es va realitzar a 42°C durant 1 h. La PCR es va realitzar a partir del cDNA obtingut anteriorment en la següent barreja de reacció: 10X PCR Buffer sense Mg (20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl), 200 µM de cada dNTP i 0.2 µM d'encebadors específics en un volum final de 50 µl amb 1U Taq polimerasa (Invitrogen). Les concentracions de magnesi utilitzades van ser optimitzades per cada gen a amplificar. Les condicions utilitzades en la PCR van ser: una desnaturalització prèvia de 5 min. a 94°C; cicles de 30 sg. a 94°C, 30 sg. a la temperatura d'anellament específica per cada parell de encebadors, 45 sg. a 72°C i una elongació final de 5 min. a 72°C. Una mostra que contenia tots els reactius excepte el cDNA també es va incloure com a control negatiu de la reacció.

Els productes d'amplificació van ser visualitzats mitjançant un gel d'agarosa al 2% en TAE (399 mM Tris base, 20 mM àcid acètic glacial, 1 mM EDTA (pH=8)) on 15 µl de les

mostres eren carregats i correguts a 70V en cubetes d'electroforesi. El gel es va observar en un transil·luminador de llum ultraviolada.

14.3. Mètode semiquantitatiu

Per comparar l'expressió relativa dels gens de la IL-1 β i iNOS entre mostres de diferents condicions es va utilitzar un mètode de RT-PCR semiquantitativa. El gen problema va ser amplificat juntament amb un gen constitutiu, el gen de la ciclofilina, en el mateix tub per tal d'ajustar la quantitat de cDNA del gen problema respecte aquest gen constitutiu. Prèviament a l'estudi de les mostres problema es va determinar en quin rang de cicles s'havia de treballar per estar en la fase exponencial d'amplificació. En aquestes condicions el senyal del producte amplificat serà proporcional a la quantitat del cDNA retrotranscrit a partir del mRNA extret. Els gens de la IL-1 β i iNOS van ser amplificats a 34 cicles i el gen de la ciclofilina a 28 cicles, cicles en què es treballava en la fase exponencial d'amplificació de cada gen. Per comprovar que es seguia treballant en aquesta fase exponencial d'amplificació per cada mostra es van recollir 15 μ l dels productes amplificats a diferents cicles, concretament a 28, 30 i 34 cicles. Aquests productes van ser correguts en un gel i transferits igualment a una membrana de nilo. A la vegada que es van amplificar les mostres problema es va afegir en cada reacció d'amplificació una mateixa mostra d'illots frescos, que corresponia a una barreja de cDNA de mostres d'illots procedents de diferents aïllaments, que va ser utilitzada com a control positiu de la reacció.

14.4. Encebadors

Els encebadors utilitzats van ser els prèviament publicats a la bibliografia (17,151,352) o bé dissenyats mitjançant el programa de disseny d'oligonucleòtids, Primer Express (Applied Biosystems, USA).

Les condicions d'amplificació dels diferents gens són les següents (Taula 1):

Taula 1.

Encebador	Seqüència	T°		
		Anellament	MgCl ₂	Amplicó
IL-1β	5' dCCTGTGGCCTTGGGCCTCAA 3' dGGTGCTGATGTACCAGTTGGG	60°C	2 mM	204 bp
iNOS	5' dTCCCCACATTCTCTTTCCTTT 3' dCAAGCGGTCGTTGGGAGTG	58°C	1.5 mM	204 bp
NKT	5' dATCTTGCCTCCGCTTTC 3' dAGGTTCCCGACACAGCTG	55°C	1.4 mM	287 bp
Ciclofilina	5' dAACCCACCGTGTTCTTC 3' dTGCCTTCTTTCACCTTCCC	Depenent gen problema	Depenent gen problema	399 bp

14.5. Protocol d'hibridació

Per detectar l'amplificació dels gens problemes es va utilitzar la tècnica de 'Southern blotting': el gel d'agarosa es va incubar amb una solució desnaturalitzant (1.5 M NaCl i 0.5 M NaOH) durant 45 min., després amb una solució neutralitzant (1.5 NaCl i 0.5 M TrisBase (pH 6)) durant 45 min. i es va realitzar la transferència dels fragments amplificats a membranes de nilo HybondTM(Amersham, Regne Unit). La transferència es va realitzar en tampó 2xSSC durant tota la nit i posteriorment es va fixar el DNA a la membrana 2 h a 80°C. Un cop fixat el DNA a la membrana es procedí a realitzar la prehibridació. Es van prehibridar les membranes durant 1 h en 0.5 M tampó fosfat (pH 7.2), 10 mM EDTA i 7% SDS. Després es va fer un canvi de tampó i es va afegir 20 pmol de la sonda marcada. La pre-hibridació i la hibridació es va realitzar a la temperatura adequada per cada sonda durant tota la nit. La sonda es va marcar amb γ (³²P) dATP (Amersham) utilitzant un kit comercial (Synthetic Oligonucleotides 5'-end Labelling kit, MBI Fermentas, Alemanya).

Les membranes es van rentar dues vegades amb tampó 2xSSC i 0.1% SDS a 37°C durant 15 min. i es van deixar en contacte amb un film durant 3-7 dies a -70°C.

Les sondes utilitzades es van dissenyar de forma que tinguessin la seva homologia en regions internes del material amplificat utilitzant el programa de disseny Primer Express (Applied Biosystems, USA) i el programa de la xarxa Xprimer (<http://alces.med.umn.edu/rawprimer.html>) i van ser les següents (Taula2):

Taula 2.

Sondes	Seqüència	T° hibridació
IL-1 β	5' dATTGTTTGGGATCCACACTCTCCAG	65°C
iNOS	5' dCGGGATGGCGCCTCCTG	58°C
Ciclofilina	5' dTTTCTCTCCGTAGATGGACTTGCCACCAGTGCCA	63°C

14.6. Densitometria

Es va realitzar la densitometria mitjançant un programa d'anàlisi d'imatges, Phoretix 1D Advanced (distribuït per Pacisa, Barcelona). Els valors de densitometria es van expressar com a percentatge entre la densitometria del gen problema per la densitometria del gen de la ciclofilina. El percentatge obtingut de la mostra d'illots frescos afegida en cada reacció d'amplificació va ser considerat com a valor 100 i cada mostra va ser referida a aquest valor.

15. Anàlisi estadística

Els resultats varen expressar-se com a mitjana i error estàndard de la mitjana ($X \pm SEM$). Per a comparacions múltiples entre grups s'utilitzà l'anàlisi de la variança d'una

sola cua (ANOVA). Quan l'ANOVA va detectar diferències significatives, es va utilitzar el mètode PLSD de Fisher per a determinar les diferències específiques entre els diferents grups analitzats. S'utilitzà una P menor a 0.05 per a considerar la significació estadística. Per aquests càlculs s'utilitzà el paquet estadístic SPSS® versió 10.0 per Windows (SPSS Inc., USA).

RESULTATS

16. Evolució metabòlica dels animals d'experimentació

Tots els grups van ser comparables en relació als nivells de glicèmia i pes quan van ser injectats amb STZ (180 mg/kg de pes) (Fig.18,19 i 20.). Un 77.4% dels ratolins injectats van complir les condicions d'hiperglicèmia (>20 mg/dl), poliúria i polidípsia, incloent-los en l'estudi.

16.1. Evolució del pes

El pes dels animals el dia de la injecció amb STZ va ser similar entre els diferents grups experimentals (24-26 g). Després de 7-10 dies de la injecció amb STZ els animals van perdre entre 1 i 2 g de pes i van iniciar el tractament amb insulina o van ser trasplantats amb 100 illots.

Després del trasplantament els animals no tractats amb insulina van mantenir el pes inicialment (grup 1: 24.3 ± 0.81 g, grup 2: 24.5 ± 0.46 g), però van perdre pes de forma progressiva a mida que avançava l'estudi (grup 3: 23.0 ± 0.65 g). Després de l'extracció de l'empelt van patir una pèrdua del voltant de 2 g de pes (Fig.18.). Durant el tractament amb insulina els animals tractats van guanyar pes fins el dia del trasplantament, moment en el que havien recuperat el seu pes basal (grup 4: 24.3 ± 0.83 g, grup 5: 25.1 ± 0.38 g, grup 6: 25.1 ± 0.42 g). Després del trasplantament el pes va anar augmentant fins el dia de la retirada del tractament amb insulina (grup 4: 24.7 ± 0.74 g, grup 5: 25.4 ± 0.33), continuant augmentant posteriorment fins el dia de l'extracció de l'empelt (grup 6: 27 ± 0.18 g) (Fig.19.). Tots els grups d'animals van perdre pes una vegada extret l'empelt, indicant que els illots eren els responsables de mantenir la normoglicèmia i per tant el bon estat metabòlic dels animals.

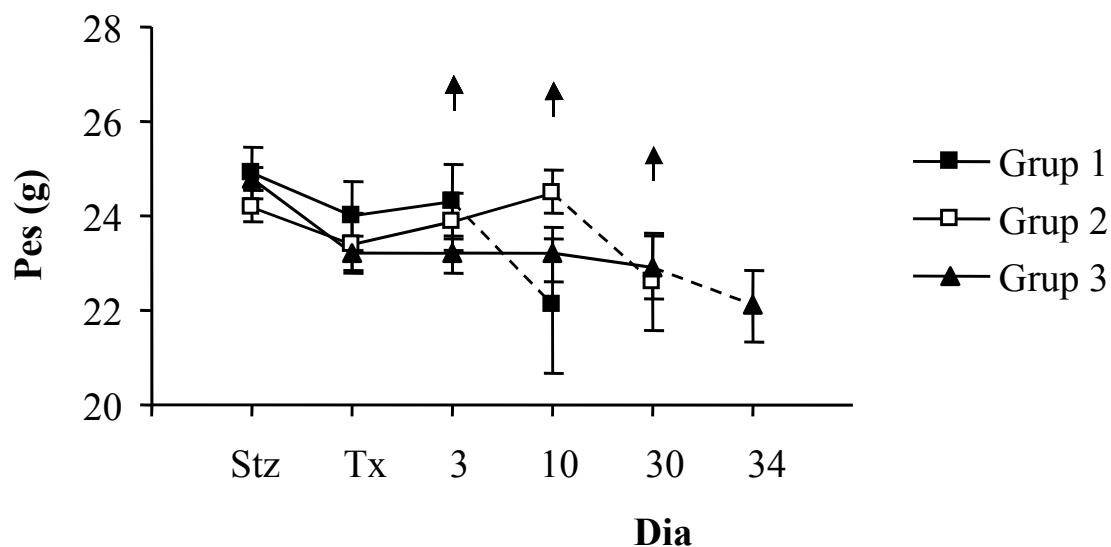


Fig.18. Evolució del pes dels grups no tractats amb insulina (Grups 1-3 de la Taula 1). Stz: correspon al dia de la injecció amb estreptozotocina; Tx: correspon al dia del trasplantament d'illots; ↑: correspon al dia de l'extracció dels empelts. Traç discontinuu: indica període posterior a la retirada de l'empelt. Els resultats són $X \pm SEM$.

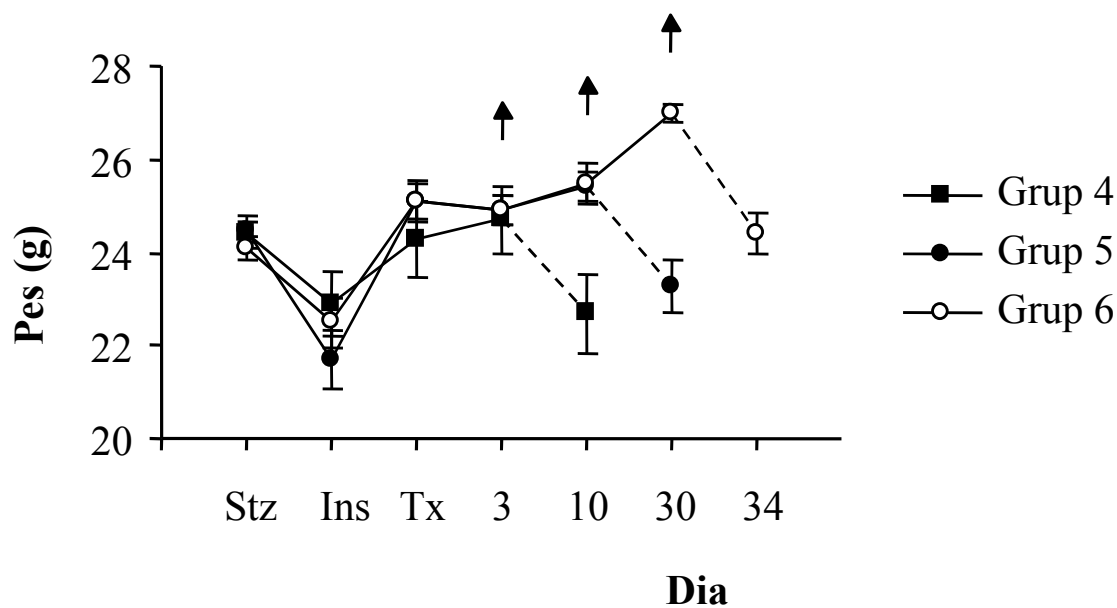


Fig.19. Evolució del pes dels grups tractats amb insulina (Grups 4-6 de la Taula 1). Stz: correspon al dia de la injecció amb estreptozotocina; Ins: correspon al dia de l'inici del tractament amb insulina; Tx: correspon al dia del trasplantament d'illots; ↑: correspon al dia de l'extracció dels empelts. Traç discontinuu: indica període posterior a la retirada de l'empelt. Els resultats són $X \pm SEM$.

16.2. Evolució de la glicèmia

L'evolució dels nivells de glicèmia dels diferents animals trasplantats es resumeix en la Taula 3 i en la Fig.20. en la que s'han agrupat els tres grups no tractats amb insulina per facilitar-ne la interpretació. El trasplantament de 100 illots fou insuficient, com esperàvem, per a restaurar la normoglicèmia i per tant els grups no tractats amb insulina van mantenir una hiperglicèmia greu després del trasplantament (3 dies: 21.9 ± 1.5 mM, 10 dies: 24.7 ± 2.2 mM, 30 dies: 24.7 ± 1.7 mM). Només un animal no tractat amb insulina va normalitzar la glicèmia després del trasplantament i va ser exclòs de l'estudi.

Per altra banda els grups tractats amb insulina van presentar uns nivells de glicèmia baixos en el moment del trasplantament que es van mantenir fins el dia de la suspensió del tractament amb insulina (3 dies: 3.7 ± 0.4 mM, 10 dies: 2.9 ± 0.3 mM). Els grups tractats amb insulina tenien uns nivells de glicèmia inferiors que els animals del grup control durant el tractament amb insulina (grup tractat amb insulina: 3.70 ± 0.18 mmol/l; grup control: 6.30 ± 0.09 mmol/l; $P < 0.001$). Quan el tractament amb insulina es va suspendre els nivells de glicèmia van augmentar transitòriament en el dia 15 (grup 6: 10.1 ± 1.7 mmol/l; grup control: 5.65 ± 0.13 mmol/l; $P = 0.035$) i 21 després del trasplantament (grup 6: 9.31 ± 1.13 mmol/l; grup control: 6.46 ± 0.31 mmol/l; $P = 0.045$), però els animals van restablir la normoglicèmia el dia 30 després del trasplantament (7.1 ± 0.7 mM). Després de suspendre el tractament amb insulina un 70% dels animals van mantenir la normoglicèmia, malgrat haver estat trasplantats amb una massa beta insuficient, indicant els efectes beneficiosos del tractament amb insulina. Només els animals que van normalitzar la glicèmia de manera estricta després de la retirada del tractament amb insulina van ser inclosos en l'estudi.

L'extracció dels empelts en tots els animals normoglicèmics va provocar la seva tornada a una hiperglicèmia greu (>20 mmol/l), demostrant que els illots trasplantats eren els responsables del manteniment de la normoglicèmia (Fig.20.).

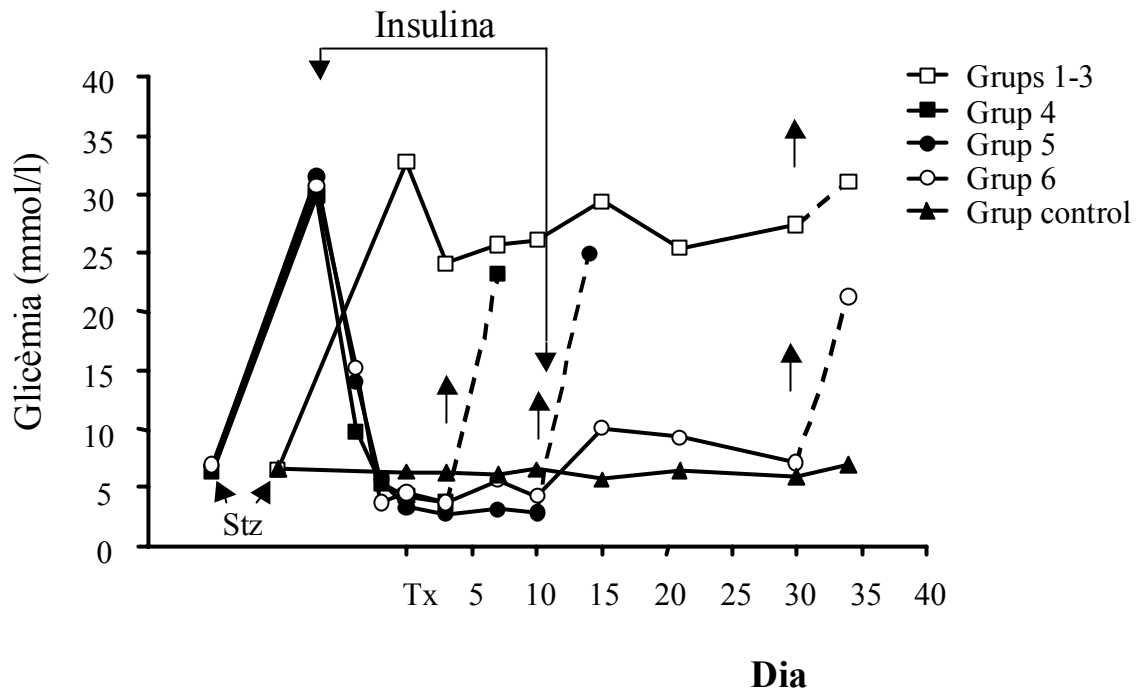


Fig.20. Evolució de la glicèmia en els grups experimentals de ratolí. Stz: correspon al dia de la injecció amb estreptozotocina; Tx: correspon al dia del trasplantament d'illots; ↑: correspon al dia de l'extracció dels empelts. Traç discontinu: indica període posterior a la retirada de l'empelt. Els resultats són $X \pm SEM$.

17. Nivells d'àcids grassos lliures en plasma

Els nivells d'àcids grassos lliures (AGLs) en plasma a ratolins controls va ser de 0.13 ± 0.01 mM en animals després de menjar i de 0.27 ± 0.06 mM en animals amb un dejú de 24 h ($P < 0.05$ grup control dejú vs. grup control) (Fig.21.). Els nivells no van augmentar significativament en ratolins diabètics abans del trasplantament (0.18 ± 0.01 mM) ni a ratolins trasplantats 30 dies després del trasplantament (0.14 ± 0.01 mM). Per tant en el nostre model d'hiperglicèmia crònica els nivells de AGLs no estaven augmentats respecte els animals controls, suggerint que els àcids grassos no juguen un paper en la mort per apoptosi després del trasplantament.

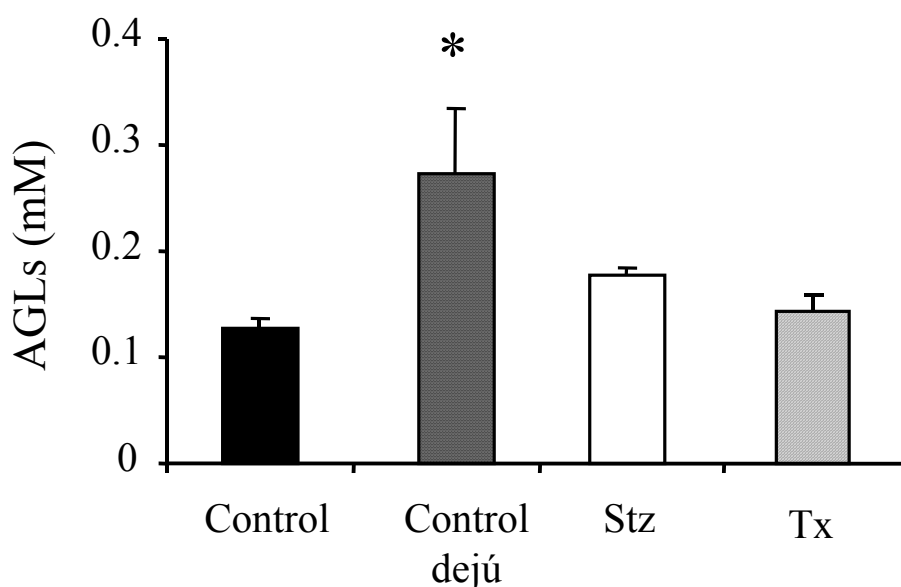


Fig.21. Nivells d'àcids grassos lliures (AGLs) en plasma de ratolins controls (columna negra), ratolins controls amb un dejú (24 h) (columna grisa), ratolins diabètics per Stz (columna blanca) i ratolins trasplantats 30 dies després del trasplantament (columna ratllada). Els resultats són $X \pm SEM$. ANOVA, $P < 0.01$; Fisher PSLD, $*P < 0.05$ grup control dejú vs. grup control i grup Tx.

18. Morfologia dels empelts

La morfologia dels empelts 3 dies després del trasplantament va ser similar en els grups hiperglicèmics i els tractats amb insulina. Després del trasplantament els illots van tendir a fusionar-se, com s'havia descrit prèviament (69), i al dia 3 després del trasplantament es podien observar extenses àrees de necrosi al centre del teixit endocrí tant en els grups hiperglicèmics com normoglicèmics. Al dia 10 no es van detectar àrees de necrosi als empelts, però per altra banda es van identificar àrees amb presència d'eritròcits ('llacs vasculars'). Malgrat que aquestes àrees van ser més grans i abundants en els empelts de ratolins hiperglicèmics, també es van identificar en els de ratolins normoglicèmics. Normalment es van trobar amb teixit endocrí formant com una anella de cèl·lules envoltant-les. El dia 30 després del trasplantament, els empelts dels ratolins normoglicèmics eren compactes, homogenis i presentaven un teixit endocrí en bon estat, com prèviament havíem descrit en trasplantaments d'illots que restauren la normoglicèmia. Per altra banda el teixit endocrí dels empelts de ratolins hiperglicèmics estava desorganitzat amb presència d'important fibrosi i la persistència de grans llacs vasculars (Fig.22.).

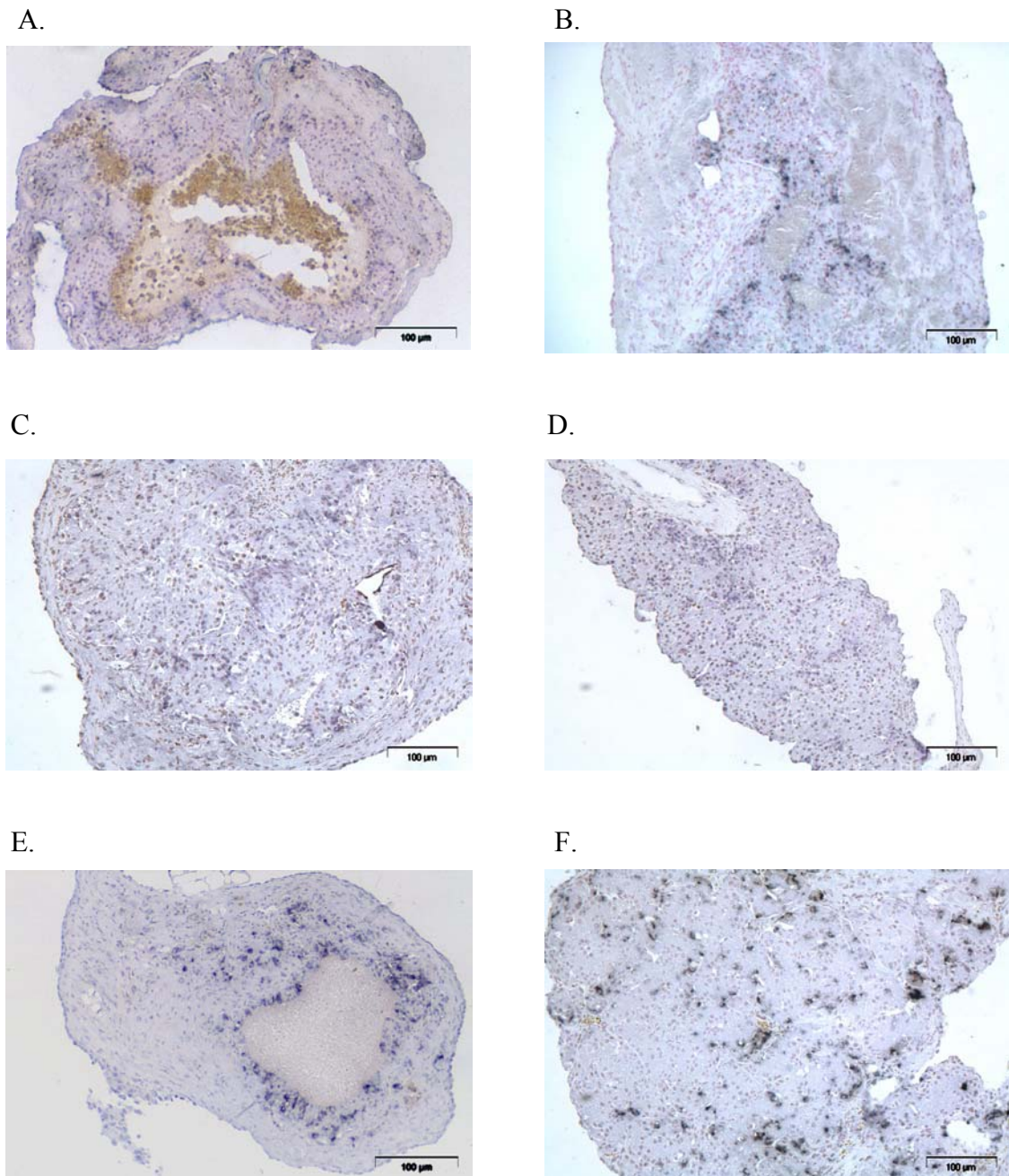


Fig.22. Seccions de talls histològics d'empelts d'illots de ratolí C57Bl/6 corresponents a animals del grup hiperglicèmic i normoglicèmic extrets als dies 3 (A,B, respectivament), 10 (C,D) i 30 dies (E,F) després del trasplantament tenyits amb immunoperoxidasa per detectar els nuclis apoptòtics mitjançant la tècnica del TUNEL i per fosfatasa alcalina per detectar les cèl·lules endocrines no beta dels illots.

19. Mort de les cèl·lules beta

19.1. Apoptosi de les cèl·lules beta pel TUNEL

Primer es va comprovar que la tinció amb el còctel d'anticossos per tenyir les cèl·lules endocrines no beta era igual de vàlida per quantificar les cèl·lules beta que la tinció amb l'anticòs anti-insulina. Els resultats d'apoptosi de les cèl·lules beta va ser similar quan es va utilitzar l'anticòs anti-insulina i el còctel d'anticossos. Els valors d'apoptosi beta quantificada tant en pàncrees d'animals control (tinció per la insulina: $0.03 \pm 0.01\%$; tinció pel còctel: $0.04 \pm 0.03\%$) com en empelts del grup 6 normoglicèmic (tinció per la insulina: $0.14 \pm 0.02\%$; tinció pel còctel: $0.12 \pm 0.02\%$) indicaven la validesa de la tinció de les cèl·lules endocrines no beta per determinar l'apoptosi de les cèl·lules beta.

L'apoptosi de les cèl·lules beta just després de l'aïllament dels illots pancreàtics no va augmentar significativament ($0.11 \pm 0.04\%$) en comparació amb l'apoptosi als illots de pàncrees d'animals control ($0.04 \pm 0.03\%$) (Fig.23.). Després de 3 i 10 dies del trasplantament, l'apoptosi de les cèl·lules beta va augmentar significativament tant en els animals hiperglicèmics (grup 1: $0.30 \pm 0.05\%$; grup 2: $0.44 \pm 0.09\%$) com en els tractats amb insulina (grup 4: $0.42 \pm 0.07\%$; grup 5: $0.48 \pm 0.08\%$) ($P < 0.05$ illots aïllats vs. grups trasplantats 2-5). Contràriament, 30 dies després del trasplantament l'apoptosi de les cèl·lules beta va mantenir-se incrementada només als empelts exposats a hiperglicèmia sostinguda (grup 3: $0.37 \pm 0.03\%$); mentre que els empelts d'animals normoglicèmics van mostrar una apoptosi beta similar a la dels illots a pàncrees d'animals control (grup 6: $0.12 \pm 0.02\%$, $P < 0.005$ pàncrees vs. grups 1-5) i significativament més baixa que la dels altres grups trasplantats.

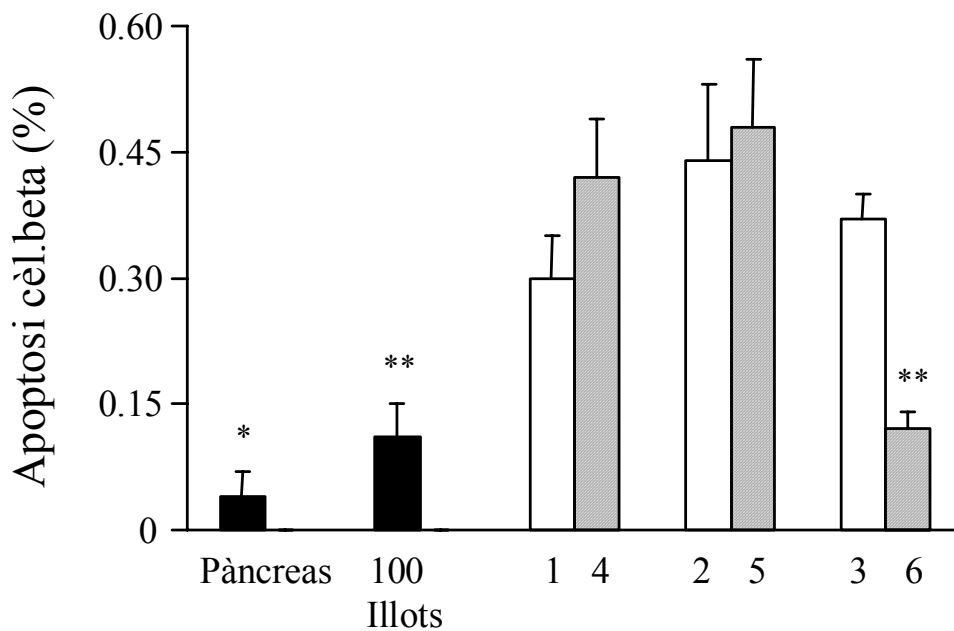


Fig.23. Apoptosi de les cèl·lules beta a pàncrees d'animals control, a illots aïllats i a illots trasplantats a animals hiperglicèmics (columnes blanques) i tractats amb insulina (columnes ratllades) per la tècnica del TUNEL. Els resultats són $X \pm SEM$. ANOVA, $P < 0.001$; Fisher PSLD, $*P < 0.005$ pàncrees vs. grups 1-5; $**P < 0.05$ 100 illots aïllats vs. grups 2-5 i 6.

19.2. Apoptosi de les cèl·lules beta per iodur de propidi

Per quantificar la mort cel·lular per apoptosi es va utilitzar la tècnica del TUNEL (Fig.25 A.), però donades les conegudes discrepàncies en relació a l'especificitat de les tècniques per diferenciar apoptosi d'altres tipus de mort cel·lular com la necrosi, es va mesurar l'apoptosi a més amb una altra tècnica, en aquest cas la tinció per iodur de propidi a 3-5 empelts de cada grup (Fig. 25 B.).

Els resultats obtinguts amb les dues tècniques van mostrar un paral·lelisme entre ells. Els resultats de la tinció per iodur de propidi van confirmar que l'apoptosi de les cèl·lules beta era alta i similar als valors obtinguts per la tècnica del TUNEL als dies 3 (grup 1: $0.41 \pm 0.14\%$; grup 4: $0.33 \pm 0.12\%$) i 10 (grup 2: $0.30 \pm 0.11\%$; grup 5: $0.40 \pm 0.09\%$) tant als grups hiperglicèmics com als tractats amb insulina (Fig.24.). Després de

30 dies del trasplantament l'apoptosi de les cèl·lules beta va mantenir-se alta només en els ratolins hiperglicèmics (grup 3: $0.26 \pm 0.01\%$). Per altra banda l'apoptosi beta en els empelts d'animals normoglicèmics no va mantenir-se elevada (grup 6: $0.09 \pm 0.06\%$) com ja havíem observat amb la tinció per la tècnica del TUNEL. La similitud entre els resultats de la tinció del TUNEL i per iodur de propidi ens confirmaven els valors d'apoptosi obtinguts.

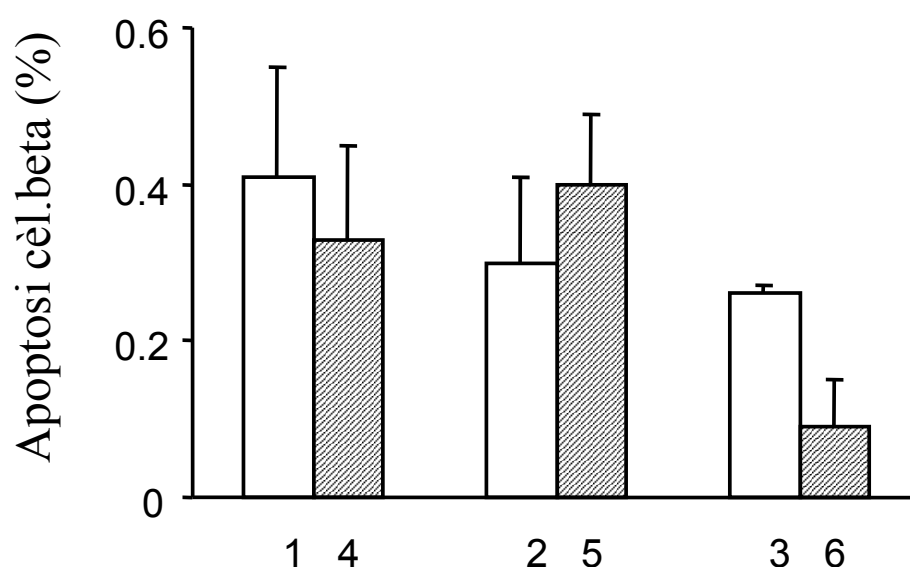
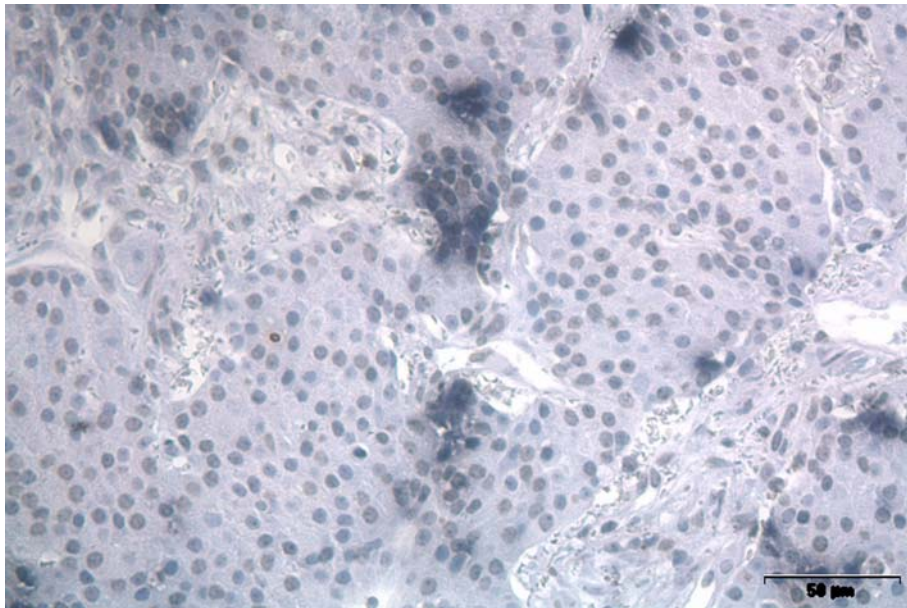


Fig.24. Apoptosi de les cèl·lules beta a illots trasplantats a animals hiperglicèmics (columnes blanques) i tractats amb insulina (columnes ratllades) determinada amb la tinció per iodur de propidi. Els resultats són $X \pm SEM$.

19.3. Àrea insular necròtica

Al dia 3 després del trasplantament s'observaren unes importants àrees necròtiques tant en els empelts de ratolins tractats i no tractats amb insulina. La localització de les àrees de necrosi al centre del teixit endocrí i la presència exclusiva de teixit endocrí al lloc del trasplantament en aquests primers dies després de la implantació estableix que les àrees necròtiques corresponien a teixit insular. L'àrea necròtica va ser del 26.8% en els ratolins tractats amb insulina i del 30.7% en els ratolins hiperglicèmics. Als dies 10 i 30 després del trasplantament la presència de zones necròtiques va ser quasi bé indetectable.

A.



B.

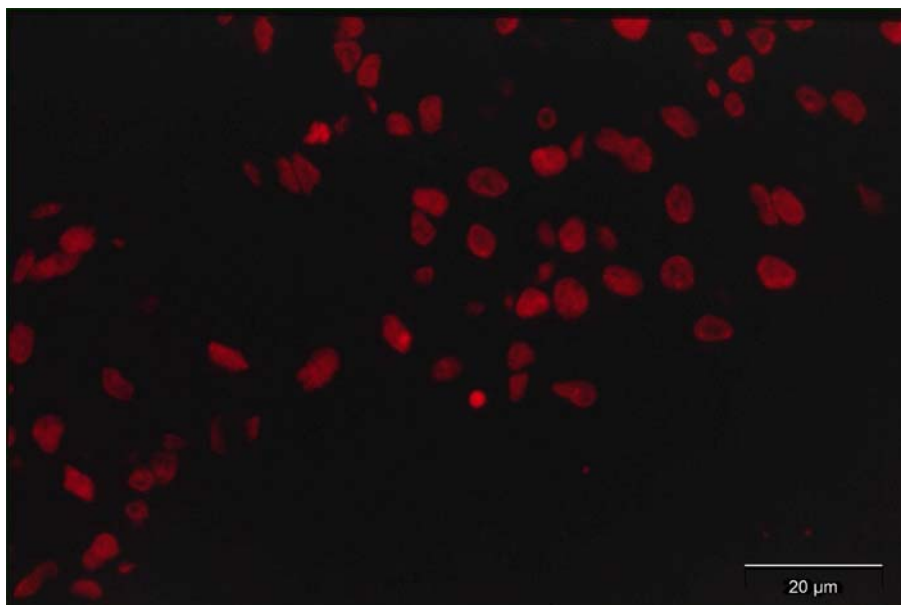


Fig.25. Seccions de talls histològics d'empelts d'illots. A, Empelt de rata Lewis corresponent a un animal del grup normoglicèmic extret 3 dies després del trasplantament tenyit amb immunoperoxidasa per detectar els nuclis apoptòtics mitjançant la tècnica del TUNEL i per fosfatasa alcalina per detectar les cèl·lules endocrines no beta dels illots. B, Empelt de ratolí C57Bl/6 corresponent a un animal del grup hiperglicèmic extret 10 dies després del trasplantament tenyit amb iodur de propidi per detectar els nuclis apoptòtics.

20. Replicació de les cèl·lules beta

La replicació de les cèl·lules beta va mantenir-se similar a la del pàncrees d'animals control (0.38 ± 0.08 %) en els primers dies després del trasplantament (grup 1: 0.35 ± 0.06 %, grup 4: 0.23 ± 0.04 %) (Fig.26.). El fet que la replicació cel·lular beta no augmentés en aquests dies primers d'hiperglicèmia després del trasplantament suggereix la presència d'una limitació en la replicació de les cèl·lules beta en aquest període. Per contra la replicació beta va augmentar en els illots trasplantats exposats a 10 dies d'hiperglicèmia (grup 2: 0.83 ± 0.13 %, $P < 0.001$ grup 2 vs. tots els altres grups) comparat amb la replicació beta dels pàncrees d'animals control i dels altres grups trasplantats, indicant que la hiperglicèmia augmenta transitòriament la replicació de les cèl·lules beta (Fig.27.)

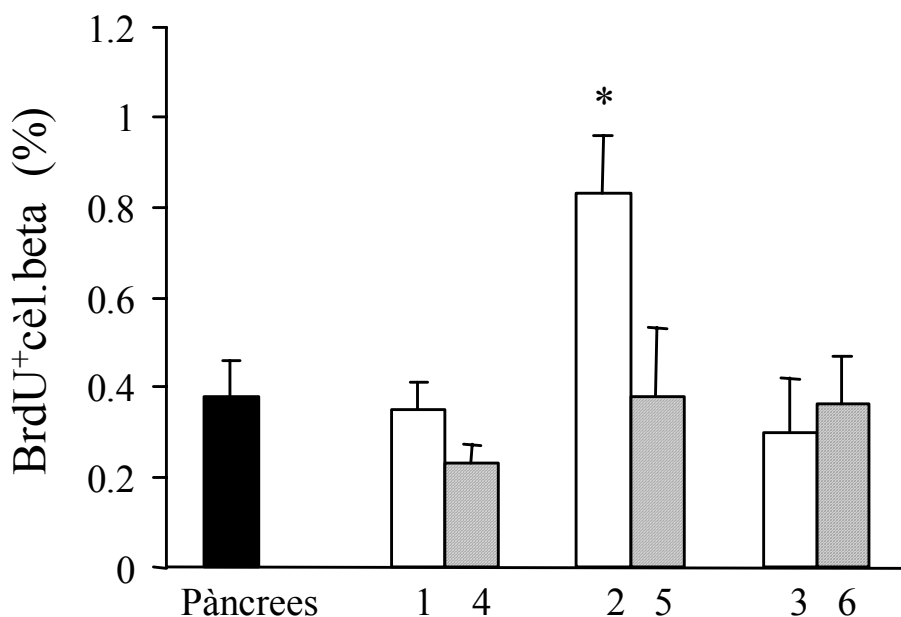


Fig.26. Replicació de les cèl·lules beta a pàncrees d'animals control i a illots trasplantats a animals hiperglicèmics (columnes blanques) i tractats amb insulina (columnes ratllades). Els resultats són $X \pm SEM$. ANOVA, $P < 0.001$; Fisher PSLD, $*P < 0.001$ grup 2 vs. tots els altres grups.

L'increment de la replicació en els empelts exposats a hiperglicèmia no es va mantenir 30 dies després del trasplantament, quan la replicació de les cèl·lules beta va ser similar en el grup hiperglicèmic i normoglicèmic (grup 3: $0.30 \pm 0.12\%$, grup 6: $0.36 \pm 0.11\%$) respecte a la dels pàncrees del grup control. Aquest fet indicaria que en condicions d'hiperglicèmia crònica existeix una limitació en la replicació de les cèl·lules beta.

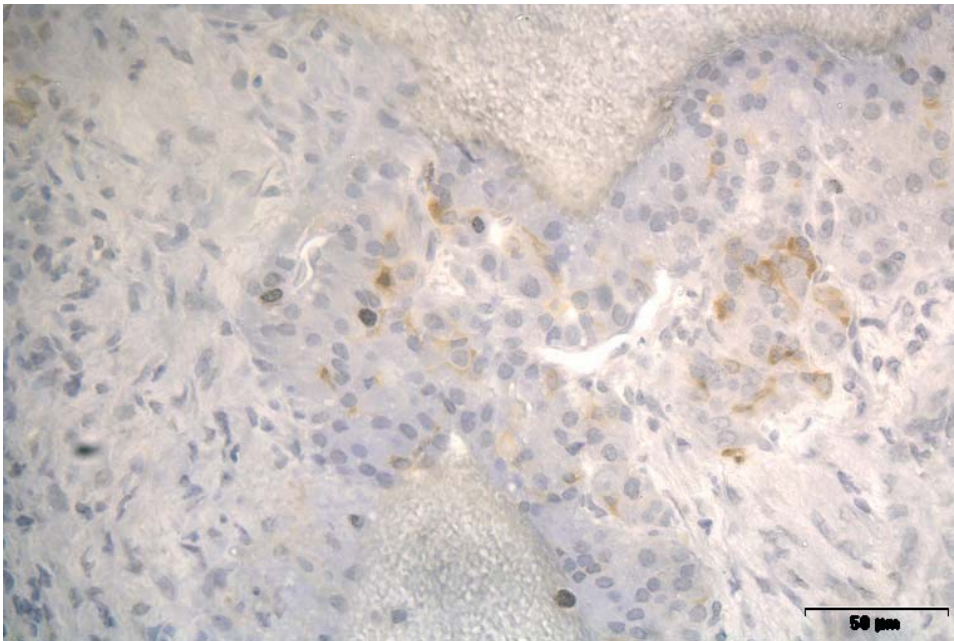


Fig.27. Secció d'un tall histològic d'un empelt d'illots de ratolí C57Bl/6 corresponent a un animal del grup hiperglicèmic extret 10 dies després del trasplantament tingut amb immunoperoxidasa per la BrdU (nucli gris) i per immunoperoxidasa per detectar les cèl·lules endocrines no beta dels illots.

21. Àrea individual de la cèl·lula beta

L'àrea individual de les cèl·lules beta a illots aïllats va ser de $93 \pm 3 \mu\text{m}^2$ (Fig.28.). Tres dies després del trasplantament la mida de les cèl·lules beta trasplantades va ser similar en els empelts d'animals hiperglicèmics i en els normoglicèmics, tractats amb insulina (grup 1: $122 \pm 10 \mu\text{m}^2$, grup 4: $113 \pm 9.4 \mu\text{m}^2$), si bé estava lleugerament augmentada en el grup hiperglicèmic comparat amb la mida dels illots aïllats ($P < 0.05$ illots aïllats vs. grup 1). Deu dies després del trasplantament la mida de les cèl·lules beta

va augmentar de forma clara només en els animals hiperglicèmics (grup 2: $146 \pm 7 \mu\text{m}^2$, grup 5: $119 \pm 5.6 \mu\text{m}^2$) i es va mantenir incrementada 30 dies després del trasplantament (grup 3: $127 \pm 12 \mu\text{m}^2$). En els empelts d'animals tractats amb insulina després de la retirada del tractament amb insulina la mida de les cèl·lules beta va augmentar, presumiblement com a resposta a l'augment de demanda metabòlica, ja que els empelts eren els responsables de mantenir la normoglicèmia (grup 6: $163 \pm 6 \mu\text{m}^2$) ($P < 0.01$ illots aïllats vs. grups 2, 3 i 6).

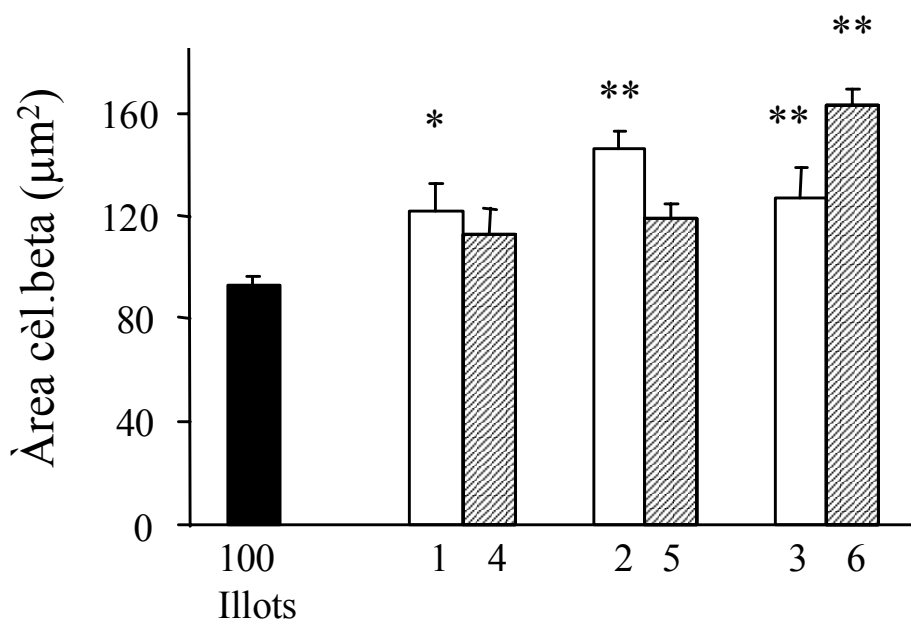


Fig.28. Àrea individual de les cèl·lules beta a illots aïllats i a illots trasplantats a animals hiperglicèmics (columnes blanques) i tractats amb insulina (columnes ratllades). Els resultats són $X \pm \text{SEM}$. ANOVA, $P < 0.001$; Fisher PSLD, $*P < 0.05$ 100 illots aïllats vs. grup 1; Fisher PLSD, $**P < 0.01$ 100 illots aïllats vs. grups 2, 3 i 6.

22. Massa de les cèl·lules beta

La massa cel·lular beta inicialment trasplantada ($0.13 \pm 0.011 \text{ mg}$) va reduir-se dràsticament i de forma similar al dia 3 després del trasplantament tant en animals hiperglicèmics com en animals tractats amb insulina (grup 1: $0.048 \pm 0.002 \text{ mg}$; grup 4: $0.046 \pm 0.007 \text{ mg}$) (Fig.29.). En animals hiperglicèmics la massa de les cèl·lules beta va

augmentar de forma transitòria al dia 10 després del trasplantament (grup 2: 0.107 ± 0.015 mg), en concordança amb la hiperplàsia i hipertròfia de les cèl·lules beta que havíem descrit davant la hiperglicèmia transitòria (Fig.26. i Fig.28.). Però després de 30 dies d'hiperglicèmia sostinguda, la massa beta va tornar a reduir-se (grup 3: 0.046 ± 0.017 mg).

Per altra banda, en els animals tractats amb insulina la massa de cèl·lules beta es va mantenir reduïda al dia 10 (grup 5: 0.062 ± 0.010 mg) respecte a la massa inicialment trasplantada, previsiblement degut a què els animals encara rebien el tractament amb insulina i els illots no eren necessaris per mantenir la normoglicèmia. En retirar el tractament amb insulina i per tant augmentar la demanda metabòlica sobre els illots trasplantats la massa beta va augmentar fins a un valor similar a la massa inicialment trasplantada, moment en el qual els illots trasplantats van ser els únics responsables del manteniment de la normoglicèmia (grup 6: 0.107 ± 0.015 mg) ($P < 0.001$ illots aïllats i grups 2 i 3 vs. tots els altres grups).

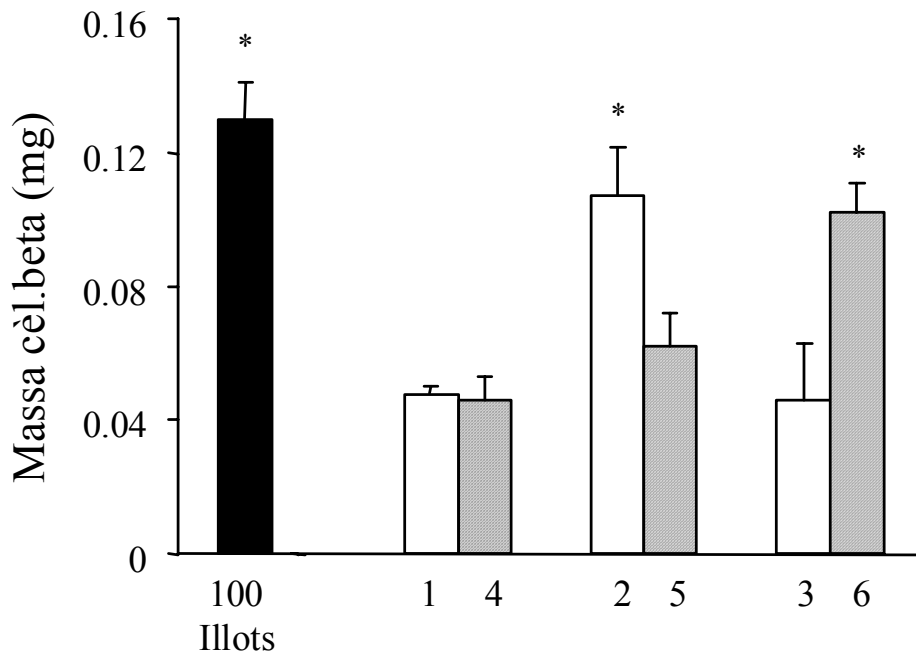


Fig.29. Massa de les cèl·lules beta a illots aïllats i a illots trasplantats a animals hiperglicèmics (columnes blanques) i tractats amb insulina (columnes ratllades). Els resultats són $X \pm SEM$. ANOVA, $P < 0.001$; Fisher PSLD, $*P < 0.001$ 100 illots aïllats i grups 2 i 6 vs. tots els altres grups.

23. Mediadors citotòxics en illots pancreàtics trasplantats

Un cop descrita l'existència d'una pèrdua important de cèl·lules beta en els primers després del trasplantament degut a la mort cel·lular per apoptosi i necrosi, vàrem hipotetitzar que aquest augment de la mort de les cèl·lules beta podia està relacionat amb un procés d'inflamació no-específica en el que mediadors citotòxics com citocines i NO hi jugarien un paper. L'estudi es va centrar en els mecanismes implicats en aquest augment de mort i es va utilitzar un model singènic de rata, per poder disposar així de suficient mostra per realitzar-lo.

23.1. Model d'hiperglicèmia i normoglicèmia en rata

Per poder disposar d'un model d'hiperglicèmia i normoglicèmia en rata, equivalent al model ben establert prèviament en ratolí, trasplantant el mateix número d'illots i comprovar que el manteniment de la normoglicèmia tenia un efecte beneficiós sobre les cèl·lules beta trasplantades es van realitzar uns experiments preliminars.

Primer es va estandarditzar quin seria el tractament amb insulina en rata. Rates diabètiques per STZ van ser tractades amb insulina mitjançant diferents implants d'insulina subcutanis descrits anteriorment a l'apartat 6.2. de Tractament amb insulina per assajar quin seria el tractament adequat per restaurar la normoglicèmia en rata. El tractament òptim va ser d'un sol implant, evitant així hipoglicèmies que conduïssin a la mort de l'animal. Posteriorment es van realitzar una sèrie de trasplantaments per comprovar que el manteniment de la normoglicèmia tenia un efecte beneficiós sobre les cèl·lules beta trasplantades. Després de 7 dies de la injecció amb STZ es van trasplantar rates diabètiques amb 500 illots, una massa beta insuficient per restablir la normoglicèmia en un model de rata, o es va iniciar el tractament amb insulina. Els animals trasplantats amb 500 illots es van mantenir hiperglicèmics al llarg de l'estudi, com esperàvem. En el grup tractat amb insulina el tractament amb insulina va ser beneficiós ja que els animals van aconseguir la normoglicèmia una vegada suspesa la insulina, malgrat la insuficient

massa beta trasplantada. Però quan l'empelt va ser extret els animals no van retornar a la hiperglicèmia, suggerint que es podia haver produït un procés de regeneració del pàncrees endogen durant el tractament amb insulina (126) i que es podria evitar retardant l'inici del tractament amb insulina a 12-14 dies després de la injecció amb STZ, com així va ser (Fig.30.).

Per tant es va establir que en el model de rata utilitzat el tractament amb insulina adequat era d'un sol implant i que l'inici del tractament amb insulina o el trasplantament no es realitzaria fins després de 12-14 dies de la injecció amb STZ per evitar la possible regeneració del pàncrees. Aquests experiments preliminars van permetre reproduir l'efecte beneficiós del tractament amb insulina prèviament demostrat en ratolins i iniciar l'estudi dels mediadors citotòxics en illots trasplantats utilitzant aquest model.

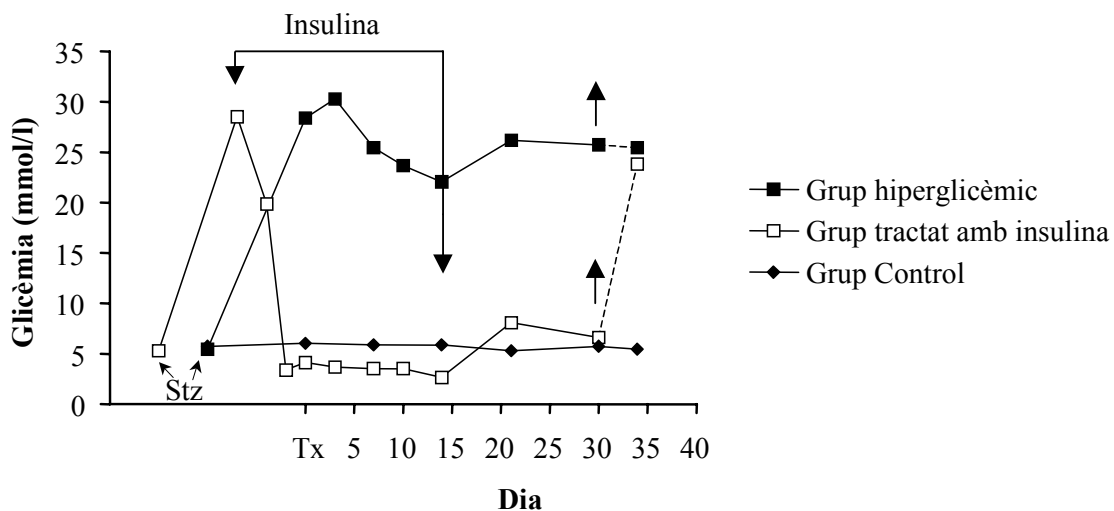


Fig.30. Evolució de la glicèmia dels grups experimentals de rata tractats i no tractats amb insulina. Stz: correspon al dia de la injecció amb estreptozotocina; Tx: correspon al dia del trasplantament d'illots; ↑: correspon al dia de l'extracció dels empelts. Traç discontinu: indica període posterior a la retirada de l'empelt. Els resultats són $X \pm SEM$.

23.2. Evolució metabòlica dels animals d'experimentació

Totes les rates injectades amb STZ van ser comparables en pes i glicèmia (Fig.31 i 32.). Un 94.4% de les rates injectades amb STZ (65 mg/kg de pes) van complir les condicions d'hiperglicèmia (>20 mg/dl), polidipsia i poliúria per a entrar a l'estudi. Les rates que no van complir aquests requisits van ser excloses.

23.2.1. Evolució del pes

Els animals injectats amb STZ van ser distribuïts a l'atzar entre els diferents grups experimentals i van ser comparables en pes (180-195 g). Després de la injecció amb STZ els animals van perdre al voltant de 10 g de pes fins que es va iniciar el tractament amb insulina o es van trasplantar amb 500 illots. El grup hiperglicèmic va mantenir el pes els dies posteriors al trasplantament (1 dia: 180 ± 6 g, 3 dies: 184 ± 5 g), augmentant lleugerament el dia 7 (7 dies: 196 ± 4 g). Per contra el grup tractat amb insulina va augmentar de pes durant els dies posteriors a l'inici del tractament amb insulina (una mitjana de 50 g) i va ser trasplantat amb un pes superior al grup hiperglicèmic (220 ± 5 g). Després del trasplantament el pes dels animals del grup tractat amb insulina va mantenir-se, augmentant posteriorment en els dies 3 i 7 (1 dia: 217 ± 12 g, 3 dies: 227 ± 5 g, 7 dies: 236 ± 5 g). Quan l'empelt va ser extret els animals dels dos grups van tornar a perdre pes (grup hiperglicèmic: 174 ± 5 g, grup normoglicèmic: 199 ± 5 g) (Fig.31).

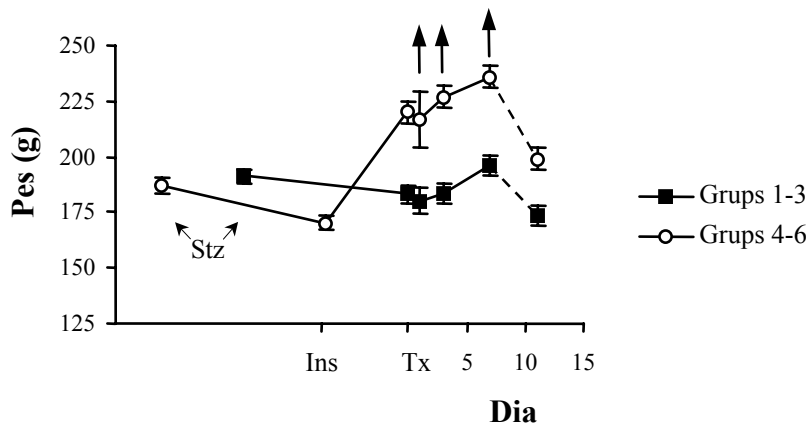


Fig.31. Evolució del pes dels grups hiperglicèmic i normoglicèmic, tractat amb insulina. Stz: correspon al dia de la injecció amb estreptozotocina; Ins: correspon al dia de l'inici del tractament amb insulina; Tx: correspon al dia del trasplantament d'illots; ↑: correspon al dia de l'extracció dels empelts. Traç discontinu: indica període posterior a la retirada de l'empelt. Els resultats són $X \pm SEM$.

23.2.2. Evolució de la glicèmia

El trasplantament de 500 illots, una massa beta insuficient per restablir la normoglicèmia en un model de rata, no va permetre normalitzar, com esperàvem, la glicèmia dels animals receptors. Els animals no tractats amb insulina es van mantenir hiperglicèmics al llarg de l'estudi (1 dia: 29.57 ± 1.68 mM, 3 dies: 25.6 ± 1.28 mM, 7 dies: 22.82 ± 1.39 mM). Per altra banda els animals tractats amb insulina trasplantats amb uns valors de glicèmia baixos (3.53 ± 0.34 mM) van mantenir-los fins al final del tractament amb insulina (1 dia: 2.26 ± 0.27 mM, 3 dies: 3.11 ± 0.33 mM, 7 dies: 2.53 ± 0.25 mM), moment en el qual es va extreure l'empelt. Després de l'extracció de l'empelt els animals van retornar a la hiperglicèmia (Fig.32.). Per tant es va disposar d'un model d'hiperglicèmia i de normoglicèmia en rata per tal de realitzar l'estudi de l'expressió dels mediadors citotòxics en illots trasplantats inicialment després del trasplantament.

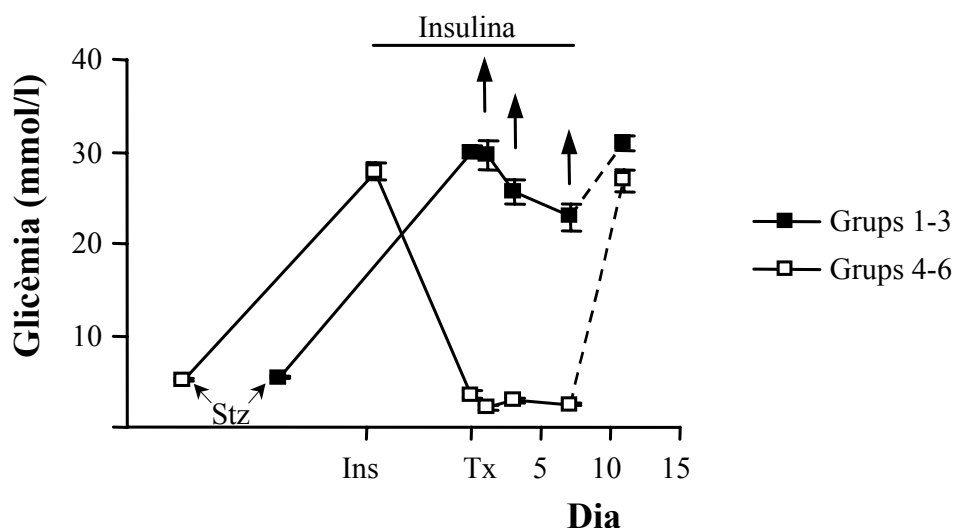


Fig.32. Evolució de la glicèmia en els grups experimentals de rata no tractats (grups 1-3) i tractats amb insulina (grups 4-6). Stz: correspon al dia de la injecció amb estreptozotocina; Ins: correspon al dia d'inici del tractament amb insulina, Tx: correspon al dia del trasplantament d'illots; ↑: correspon al dia de l'extracció dels empelts. Traç discontinu: indica període posterior a la retirada de l'empelt. Els resultats són $X \pm SEM$.

23.3. Mort de les cèl·lules beta

Abans d'iniciar l'estudi de l'expressió de IL-1 β i iNOS en illots frescos i trasplantats es va comprovar que l'apoptosi de les cèl·lules beta inicialment després del trasplantament estava augmentada en el model de rata. La mort de les cèl·lules beta per apoptosi es va mesurar per la tècnica del TUNEL en empelts 3 dies després del trasplantament.

L'apoptosi de les cèl·lules beta no va augmentar significativament en illots després de l'aïllament (0.09 ± 0.04 %) respecte l'apoptosi en pàncrees d'animals control (0.04 ± 0.01 %) (Fig.33.). Tres dies després del trasplantament l'apoptosi beta va augmentar tant en empelts d'animals hiperglicèmics com d'animals tractats amb insulina (grup 2: 0.54 ± 0.08 %, grup 6: 0.30 ± 0.07 %) ($P < 0.01$ illots aïllats vs. empelts de 3 dies). A més a més a diferència del que havíem observat en el model de ratolí C57B/16, l'apoptosi beta estava augmentada en empelts exposats a hiperglicèmia respecte els empelts d'animals

normoglicèmics, tractats amb insulina ($P < 0.01$), suggerint que la hiperglicèmia augmentaria l'apoptosi de les cèl·lules beta en aquest model de rata. Aquest fet indicaria la presència de diferències en la susceptibilitat a la hiperglicèmia entre espècies diferents.

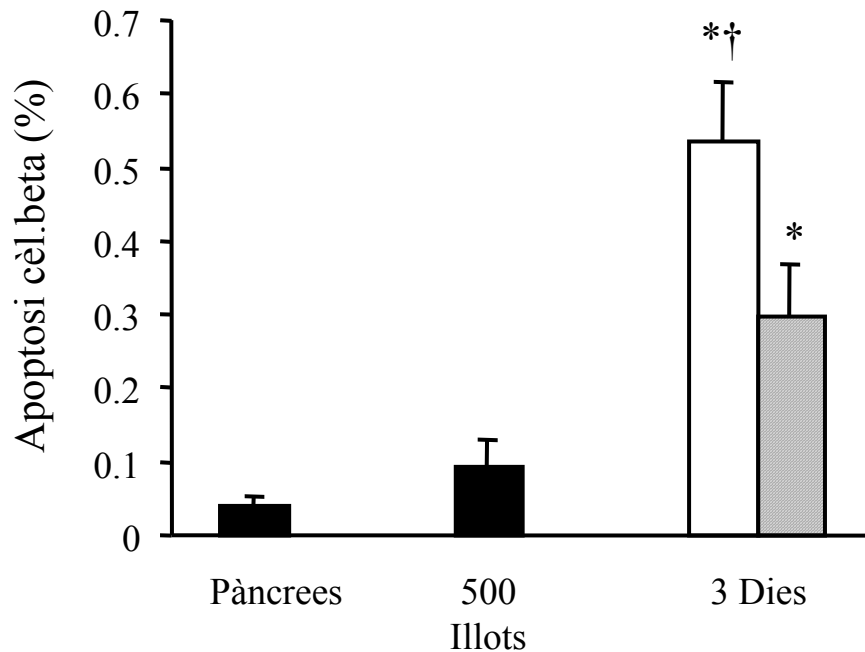


Fig.33. Apoptosi de les cèl·lules beta a pàncrees de rates control, a illots aïllats i a illots trasplantats a rates hiperglicèmiques (columnes blanques) i tractades amb insulina (columnes ratllades) per la tècnica del TUNEL. Els resultats són $X \pm SEM$. ANOVA, $P < 0.0001$; Fisher PSLD, $*P < 0.01$ pàncrees i 500 illots vs. empelts 3 dies; $\dagger P < 0.01$ empelt hiperglicèmic vs. empelt normoglicèmic.

23.4. Expressió de la interleucina-1 β i l'òxid nítric sintasa

23.4.1. Expressió d'un gen específic de ronyó (NKT)

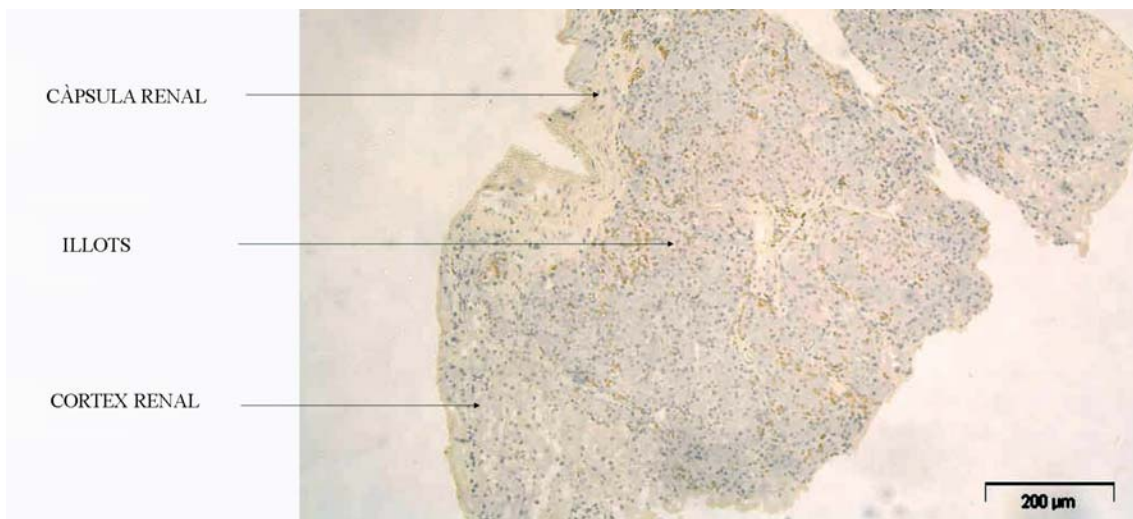
Els illots trasplantats poden adherir-se tant a la càpsula renal com al còrtex renal després del trasplantament. L'extracció de l'empelt es realitza retallant la càpsula renal al voltant de l'empelt i estirant la càpsula per endur-nos l'empelt, però degut a què els illots poden estar infiltrant el còrtex pot quedar adherit algun petit fragment de còrtex renal. Per

tant per descartar la possibilitat que les mostres estiguessin contaminades per la presència de còrtex renal es va amplificar un gen específic de còrtex renal, concretament un transportador d'ions orgànics (NKT).

Es va amplificar el gen NKT en mostres d'empelts de 7 dies després del trasplantament, ja que són les mostres més susceptibles a estar contaminades per còrtex renal. Els illots en el dia 1 i 3 després del trasplantament no es troben adherits al còrtex renal i fins i tot hi ha problemes en alguns empelts per recuperar-los en la seva totalitat, ja que tampoc no estan gaire adherits a la càpsula renal. Per altra banda en el cas dels empelts que porten més dies trasplantats, com en els de set dies, els illots estan més adherits a la càpsula renal i a més poden trobar-se adherits al còrtex renal. Si bé normalment la separació és nítida cal descartar la possibilitat que al extreure l'empelt es pugui retallar algun fragment petit de còrtex renal (Fig.34 A.).

En les mostres d'empelts de 7 dies després del trasplantament no es va detectar l'expressió del gen específic de còrtex renal (Fig.34 B.). Per tant les mostres estudiades no estaven contaminades per còrtex renal i el RNA obtingut provenia de l'empelt extret.

A.



B.

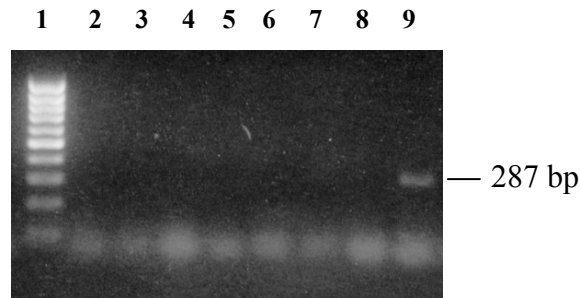


Fig.34. A, Secció d'un empelt extret 60 dies després del trasplantament on es pot observar un petit fragment de còrtex renal extret amb l'empelt. B, Expressió del gen NKT en mostres d'empelts d'animals hiperglicèmics i normoglicèmics 7 dies després del trasplantament per determinar si existeix contaminació de les mostres per còrtex renal mitjançant RT-PCR a 40 cicles. Carril: marcador de pes molecular, Carrils 2-4: mostres de RNA d'empelts d'animals hiperglicèmics, carrils 5-8: mostres de RNA d'empelts d'animals normoglicèmics i carril 9: mostra de RNA de ronyó isquèmic de rata (control positiu).

23.4.2. Expressió del gen de la interleucina-1 beta (IL- β)

Per estudiar si la inducció de l'expressió del gen de la IL-1 β s'iniciava en el procés d'aïllament dels illots es va examinar si els illots després de l'aïllament, abans de trasplantar-los, presentaven expressió del gen de la IL-1 β . Es van realitzar 6 aïllaments d'illots en diferents dies, es va extraure el RNA i es va analitzar l'expressió del gen de la IL-1 β per RT-PCR. En cinc de les sis mostres d'illots frescos es va detectar l'expressió del gen de la IL-1 β , per tant aquest fet suggeria l'inici de l'expressió de citocines proinflamatòries ja en el procés d'aïllament dels illots i a més la presència d'una variabilitat en l'expressió del gen de la IL-1 β entre els illots obtinguts en diferents processos d'aïllament.

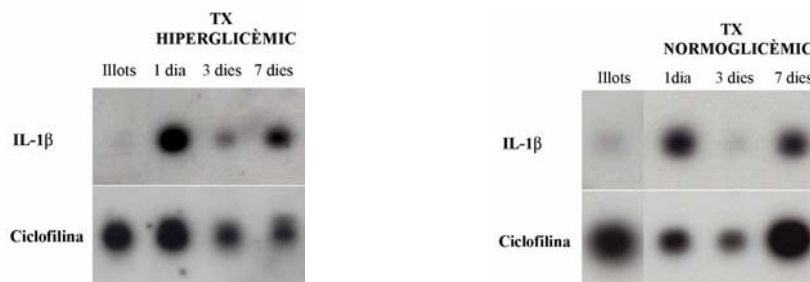
En l'estudi de l'expressió del gen de la IL-1 β en empelts d'illots es va observar que en el dia 1 després del trasplantament l'expressió del gen de la IL-1 β augmenta tant en empelts d'animals hiperglicèmics (3 vegades) com d'animals tractats amb insulina (9 vegades) en comparació als illots frescos (Fig.35 A i B). En empelts d'animals tractats

amb insulina l'expressió del gen de la IL-1 β es trobava augmentada respecte els empelts d'animals hiperglicèmics. Aquest fet podia suggerir que la hipoglicèmia relativa que patien els animals tractats amb insulina podria causar l'augment d'expressió del gen de la IL-1 β en els empelts d'aquests animals o bé que la hiperglicèmia limitaria en l'augment d'expressió del gen de la IL-1 β en aquests primers dies després del trasplantament. Per descartar que la hipoglicèmia no era la causant d'aquest augment d'expressió del gen de la IL-1 β en el grup tractat amb insulina es van trasplantar animals normals no diabètics, els quals es trobaven completament normoglicèmics. L'expressió del gen de la IL-1 β es va trobar augmentada en els empelts d'animals normals no diabètics (12 vegades) de forma similar als empelts d'animals tractats amb insulina, indicant que la lleugera hipoglicèmia no va ser la causant de l'augment d'expressió del gen de la IL-1 β respecte els empelts d'animals hiperglicèmics. Aquestes dades confirmaven que els empelts d'animals hiperglicèmics presentaven una limitació en l'augment d'expressió del gen de la IL-1 β .

En els empelts del grup tractat amb insulina l'expressió del gen de la IL-1 β es va mantenir augmentada en el dia 3 (7 vegades) respecte els illots frescos, per posteriorment presentar uns nivells similars als del grup hiperglicèmic en el dia 7 després del trasplantament. Per altra banda en els empelts del grup hiperglicèmic l'expressió del gen de la IL-1 β es mantenia augmentada de forma similar en el dia 3 i 7 després del trasplantament respecte el dia 1. (Fig.35 A i B.).

Per tant aquestes dades demostraven un augment de l'expressió del gen de la IL-1 β després del trasplantament, principalment en els empelts del grup tractat amb insulina, fet que ens suggeria que la hiperglicèmia limitaria aquest augment d'expressió del gen de la IL-1 β en els dies posteriors al trasplantament.

A.



B.

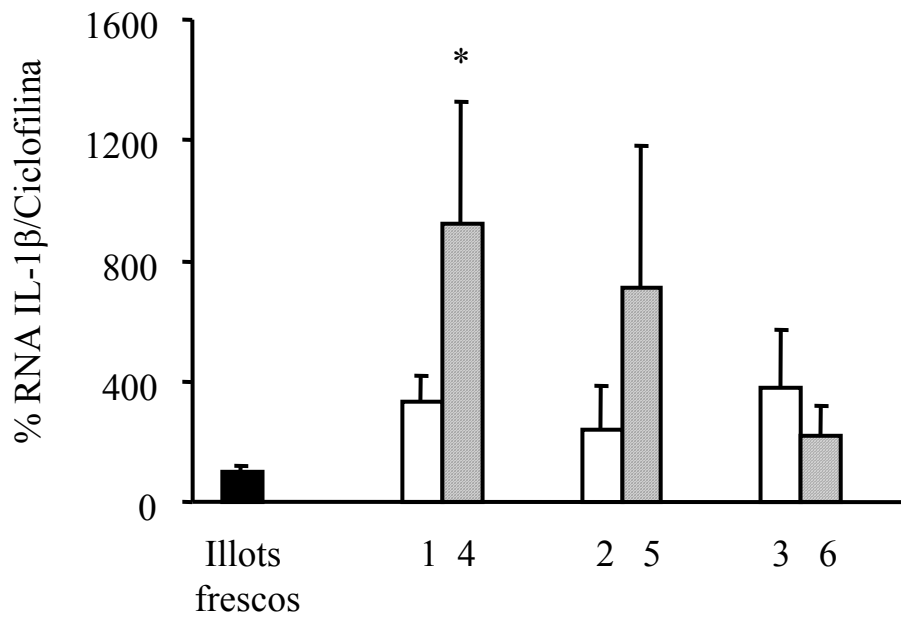


Fig.35. Anàlisi per RT-PCR de l'expressió del mRNA de IL-1 β i ciclofilina. A, Exemple representatiu dels productes de RT-PCR corresponents al gen de la IL-1 β i ciclofilina en illots frescos i en empelts d'animals hiperglicèmics i tractats amb insulina 1, 3 i 7 dies després del trasplantament. B, Representació gràfica dels resultats expressats com a percentatge de mRNA de IL-1 β /Ciclofilina a illots frescos i empelts 1, 3 i 7 dies després del trasplantament a animals hiperglicèmics (columnes blanques) i normoglicèmics (columnes ratllades). Els resultats són $X \pm SEM$. ANOVA entre els illots frescos i els grups 1 i 4, $P < 0.05$; Fisher PSLD, $*P < 0.01$ illots frescos vs. grup 4.

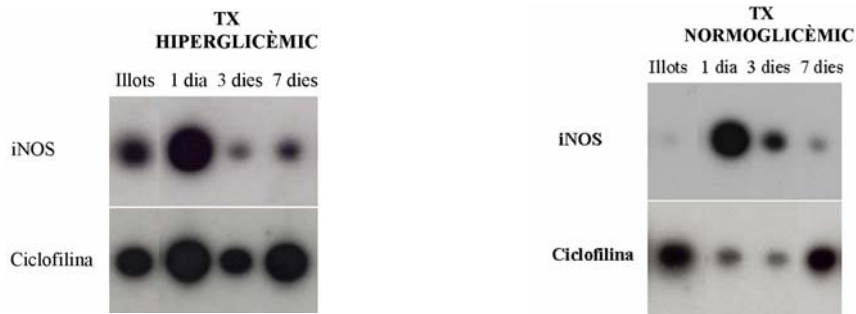
23.4.3. Expressió del gen de l'òxid nítric sintasa induïble (iNOS)

Es ben conegut que la IL-1 β activa l'expressió del gen iNOS, enzim encarregat de catalitzar la producció de NO, mitjançant l'activació del factor de transcripció NF κ B que regula la transcripció del gen iNOS. Per tant l'augment en l'expressió del gen de la IL-1 β a empelts d'illots ens va conduir a estudiar l'expressió del gen iNOS.

El dia 1 després del trasplantament l'expressió del gen iNOS va augmentar tant en el grup hiperglicèmic (5 vegades) com en el grup normoglicèmic, tractat amb insulina (14 vegades) en comparació als illots frescos (Fig.36 A i B.). En els empelts del grup tractat amb insulina l'expressió del gen iNOS es trobava significativament augmentada respecte als del grup hiperglicèmic (ANOVA, $P < 0.01$; $P < 0.05$ grup 1 vs. grup 4). L'augment en l'expressió del gen iNOS en els empelts del grup tractat amb insulina suggeria, a l'igual que en l'expressió del gen de la IL-1 β , dues possibles explicacions, per una banda que aquest augment d'expressió podria ser degut a la hipoglicèmia relativa que patien els animals tractats amb insulina o per altra banda que la hiperglicèmia provocaria una limitació en l'augment d'expressió del gen iNOS. L'estudi de l'expressió del gen iNOS en empelts d'animals normals no diabètics va mostrar que estava augmentada (9 vegades) respecte els empelts d'animals hiperglicèmics, descartant així que la hipoglicèmia dels animals tractats amb insulina fos la causant de l'augment d'expressió del gen iNOS. Per tant les anteriors dades suggerien que els empelts exposats a hiperglicèmia presentaven una limitació en l'augment d'expressió del gen iNOS.

En el grup tractat amb insulina l'expressió del gen iNOS no es va mantenir augmentada en el dia 3 i 7 després del trasplantament com en el dia 1, presentant uns valors similars als grup hiperglicèmic. Per altra banda en el grup hiperglicèmic l'expressió del gen iNOS es va mantenir augmentada en el dia 3, per finalment presentar uns nivells similars als dels illots frescos en el dia 7 després del trasplantament (Fig.36 A i B.).

A.



B.

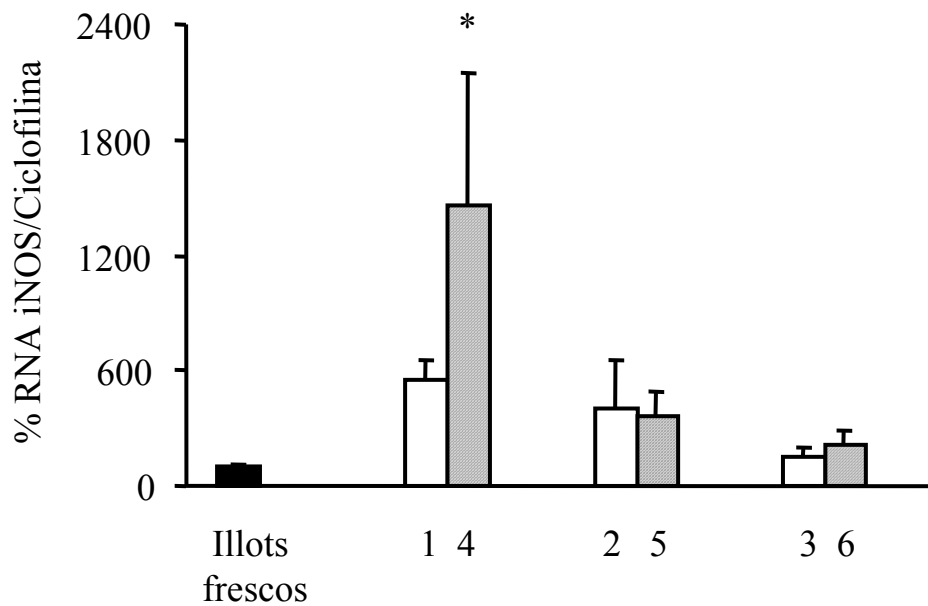


Fig.36. Anàlisi per RT-PCR de l'expressió del mRNA de iNOS i ciclofilina. A, Exemple representatiu dels productes de RT-PCR corresponents al gen iNOS i ciclofilina en illots frescos i en empelts d'animals hiperglicèmics i tractats amb insulina 1, 3 i 7 dies després del trasplantament. B, Representació gràfica dels resultats expressats com a percentatge de mRNA de iNOS/Ciclofilina a illots frescos i empelts 1, 3 i 7 dies després del trasplantament a animals hiperglicèmics (columnes blanques) i normoglicèmics (columnes ratllades). Els resultats són $X \pm SEM$. ANOVA, $P < 0.01$; Fisher PSLD, $*P < 0.05$ grup 4 vs. illots frescos i la resta de grups trasplantats.

La IL-1 β s'ha descrit que indueix l'expressió del gen iNOS tant a cèl·lules beta de línies d'insulinomes com a illots de rata adulta (95,156). Per tant es va realitzar un estudi de correlació dels valors d'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS per cada mostra estudiada i es va observar que existia una correlació significativa entre els valors obtinguts (Correlació de Pearson $r=0.589$, $P<0.01$) (Fig.37.), indicant que en el model estudiat l'expressió del gen de la IL-1 β estaria involucrat en l'augment de l'expressió del gen iNOS.

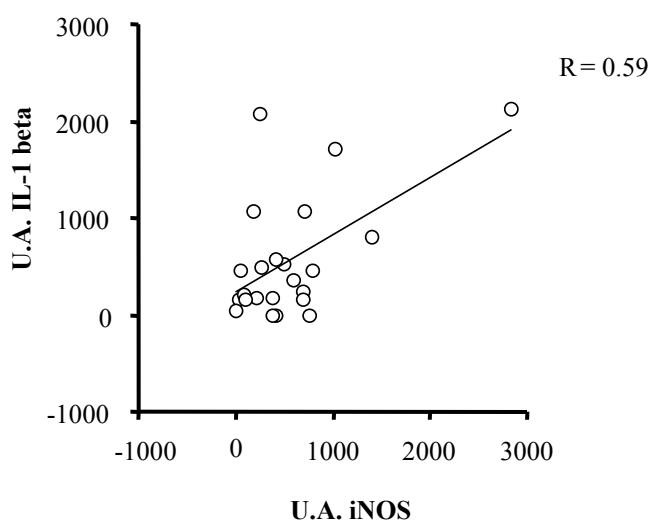


Fig.37. Representació gràfica de la relació lineal entre l'expressió del gen de la IL-1 β i el gen de iNOS. Els cercles blancs indiquen les unitats arbitràries de l'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS per cada mostra individual d'empelts d'illots ($r = 0.59$, $P<0.01$). Les unitats arbitràries (U.A.) corresponen al percentatge de mRNA de IL-1 β /Ciclofilina o iNOS/Ciclofilina.

En conjunt aquests resultats mostraven que l'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS estava augmentada en empelts d'illots en els primers dies després del trasplantament. Es va demostrar la presència d'una limitació en l'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS davant de condicions d'hiperglicèmia en el dia 1 després del trasplantament. A més els resultats confirmaven que la IL-1 β estaria implicada en l'augment de l'expressió del gen iNOS en un model de rata in vivo.

DISCUSSIÓ

En aquest estudi s'ha demostrat que en els primers dies després del trasplantament d'illots es produeix una important pèrdua de teixit trasplantat. Més de la meitat de la massa beta trasplantada es va perdre degut a un augment de la mort cel·lular beta tant per processos d'apoptosi com de necrosi. En aquests primers dies després del trasplantament hem identificat l'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS en l'empelt, indicant la presència d'un procés inflamatori en el lloc d'implantació dels illots que podria jugar un paper en l'augment de l'apoptosi i necrosi detectada. L'augment en l'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS es produí tant a animals diabètics hiperglicèmics com a animals diabètics normoglicèmics per tractament amb insulina. Els animals hiperglicèmics presentaven una expressió menys augmentada dels gens de la IL-1 β i iNOS que els normoglicèmics, suggerint la possible existència d'una limitació en l'augment d'expressió d'aquests gens en els empelts exposats a hiperglicèmia. L'augment en l'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS, amb una correlació significativa entre ells, suggereix que l'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS participa en la mort cel·lular observada en els primers dies després del trasplantament.

La massa cel·lular beta és el resultat d'un balanç entre processos de neogènesi, replicació, mort cel·lular i canvis en la mida cel·lular (40). Els processos de neogènesi són importants per l'expansió de la massa cel·lular durant el desenvolupament (102), però en pàncrees adults la neogènesi es produeix amb una freqüència baixa. A més la font més probable de cèl·lules precursors, els ductes pancreàtics, no són trasplantats amb els illots. Així doncs, en el cas del trasplantament d'illots l'estudi de la mort, la replicació i la mida cel·lular beta ens permet avaluar de forma completa els factors que condicionen l'evolució de la massa beta trasplantada. La vulnerabilitat dels illots trasplantats en aquests primers dies ha estat estudiada prèviament, descrivint-se una important disfunció i mort de les cèl·lules de l'illot després del trasplantament (69). La pèrdua de massa beta, però, no havia estat quantificada. Tres dies després del trasplantament hem observat que el teixit insular necròtic corresponia al voltant del 30 % del teixit insular i la mort per apoptosi presentava un augment de 10 vegades respecte l'apoptosi en els pàncrees d'animals control. Aquests dos processos de mort van conduir a una pèrdua d'un 60 % de la massa beta trasplantada

tant en empelts d'animals hiperglicèmics com d'animals tractats amb insulina. Si tenim en compte que el trasplantament es realitzà en condicions òptimes com són la utilització d'un model singènic, l'absència de tractaments immunosupressors i la selecció de la mida dels illots a trasplantar, aquesta pèrdua encara és més significativa. L'ús d'animals singènics pel trasplantament permet descartar la contribució del rebuig en la pèrdua de massa beta i a més a més evita l'ús dels tractaments immunosupressors al llarg de l'estudi. S'ha descrit que certs tractaments immunosupressors poden ser tòxics pel teixit trasplantat i que aquests tractaments poden ser una de les causes de la pèrdua de teixit insular després del trasplantament (308). Per tal de reduir la mort per hipòxia només els illots d'un diàmetre inferior a 200 μm varen ser usats pel trasplantament, ja que els illots més grans pateixen més hipòxia. Finalment els illots van ser trasplantats sota la càpsula renal que ha estat considerat el lloc que ofereix millors condicions pel creixement de les cèl·lules dels illots trasplantats (218). La important pèrdua de massa beta malgrat les condicions òptimes del trasplantament va reafirmar la importància de l'estudi dels mecanismes de mort dels illots trasplantats en els primers dies després del trasplantament.

La mort cel·lular beta va augmentar en els primers dies després del trasplantament, tant per processos d'apoptosi com de necrosi. Els dos fenòmens han estat quantificats per primera vegada en illots trasplantats. Així i tot la contribució exacta de cadascun dels processos en la reducció de la massa beta no pot establerta amb precisió. La mort per necrosi observada al dia 3 va correspondre al voltant del 30% del teixit insular. Per altra banda malgrat que els valors d'apoptosi van ser baixos es va produir un augment de 10 vegades en l'apoptosi de les cèl·lules beta respecte els valors bassals. Si tenim en compte que el procés és molt ràpid (< 3 h) (203) i que en el teixit normal el percentatge de cèl·lules beta apoptòtiques és quasi indetectable, la mort per apoptosi probablement té un paper significatiu en la mort total de les cèl·lules beta. Davalli et al. varen descriure, en un model de trasplantament d'illots en ratolins singènics, que el percentatge de cèl·lules beta apoptòtiques augmentava fins al 6-8.5 % en illots trasplantats respecte els illots en pàncrees d'animals control (0.5 %) (69). Considerant la rapidesa del procés d'apoptosi aquest percentatge del voltant del 10 % comportaria la desaparició total del teixit en tres

dies, suggerint que probablement havien sobreestimat el percentatge de cèl·lules apoptòtiques. Per contra els percentatges d'apoptosi beta i de necrosi del teixit insular que hem detectat en aquests primers dies després del trasplantament conduïrien a una reducció important, però, no total de la massa beta trasplantada, com la que hem observat. A més a més els nostres resultats han estat comprovats mitjançant dues tècniques diferents: la tècnica del TUNEL i la tinció amb iodur de propidi, obtenint resultats concordants.

S'han descrit diferents estratègies per protegir els illots trasplantats en aquests primers dies després del trasplantament, moment en el què es pot produir un procés d'inflamació no-específica, com tractaments amb nicotinamida, agent amb capacitat per eliminar radicals lliures que poden ser potencialment tòxics per les cèl·lules beta, 15-deoxispergulina, descrit com a inhibidor de la funció dels macròfags i que per tant evitaria la producció de substàncies inflamatòries, i la pravastina, un inhibidor de l'enzim 3-hidro-3-metilglutaril-coenzim A reductasa, el qual actuaria reduint les reaccions inflamatòries en empelts isogènics i per tant prevenint la no funció primària d'aquests empelts (16,163,350). En estudis previs s'havia demostrat que el tractament amb insulina tenia un efecte beneficiós sobre els illots trasplantats (223). Les cèl·lules beta d'empelts d'animals tractats amb insulina presentaven una millor funció, un contingut d'insulina preservat i a més els animals eren capaços d'augmentar la massa beta davant un augment en la demanda funcional, és a dir una vegada retirat el tractament amb insulina la massa beta augmentava per tal de mantenir la normoglicèmia (223). Per altra banda la hiperglicèmia podria afectar el flux sanguini a l'empelt per exemple reduint la tensió d'oxigen (51,150) i induint més mort cel·lular. Per tant es va hipotetitzar que la hiperglicèmia podria augmentar la mort cel·lular en els empelts d'illots trasplantats. Els efectes del tractament amb insulina sobre la massa beta trasplantada en els primers dies després del trasplantament no havien estat quantificats i tampoc si de les condicions metabòliques del receptor en aquest període podrien protegir els illots trasplantats. Totes aquestes dades ens van conduir a estudiar si les condicions metabòliques del receptor podrien contribuir a la pèrdua de massa beta en els primers dies després del trasplantament, concretament si la normoglicèmia podria reduir la pèrdua inicial de massa beta.

La pèrdua de massa beta va ser similar en el grup hiperglicèmic i en el normoglicèmic, tractat amb insulina. En el model de ratolí l'apoptosi beta en els primers dies després del trasplantament va augmentar respecte l'apoptosi a pàncrees d'animals control de forma similar tant en el grup hiperglicèmic com el grup tractat amb insulina. No es van observar diferències entre els empelts del grup hiperglicèmic i el tractat amb insulina en l'apoptosi, la necrosi ni en la pèrdua de massa beta, fet que indicava que la destrucció de cèl·lules beta inicialment després del trasplantament no depenia de les condicions metabòliques del receptor. En rata l'apoptosi beta va augmentar tres dies després del trasplantament respecte a illots de pàncrees d'animals control tal com s'havia observat en ratolí, però a més a més l'apoptosi beta va tenir un augment superior en els empelts d'animals hiperglicèmics que en els tractats amb insulina. En estudis d'illots de rata en cultiu s'ha descrit que quan es passava d'un medi 3 mM de glucosa a un 11 mM de glucosa i lliure de sèrum es produïa un augment en la supervivència de les cèl·lules beta (137). Es va suggerir que la glucosa promovia la supervivència de les cèl·lules beta mitjançant l'activació de la síntesi de proteïnes encarregades de la supressió del procés apoptòtic. Altres grups han mostrat, però que quan les cèl·lules beta de rata eren cultivades a 17 mM l'apoptosi beta augmentava (83a), indicant per tant que tant en concentracions molt baixes com altes de glucosa indueixen un augment en la mort cel·lular beta en illots de rata en cultiu. Els resultats del nostre estudi i les dades publicades indiquen la inducció de l'apoptosi davant concentracions elevades de glucosa en illots de rata tant in vivo com in vitro. Per altra banda les dades obtingudes en el model de ratolí i en el de rata suggereixen la presència d'una diferent sensibilitat a la glucosa entre illots de rata i ratolí. Aquesta diferent sensibilitat a la glucosa s'ha observat en illots humans, els quals s'ha proposat que són més susceptibles que els illots de rosegadors a la disfunció cel·lular induïda per la glucosa (85). En illots humans s'ha demostrat que un increment en la concentració de glucosa indueix l'apoptosi en cèl·lules beta (201). El mecanisme involucrat en l'activació de la mort cel·lular beta induïda per glucosa en illots humans sembla implicar l'augment d'expressió del receptor Fas, el qual pot interaccionar amb el seu lligant que s'expressa de forma constitutiva a les cèl·lules beta veïnes i conduir a la mort per apoptosi. Aquest mecanisme d'inducció de mort proposat en cèl·lules beta

humanes no pot donar-se, però, en rata, ja que les rates d'estudi utilitzades són de 2-3 mesos d'edat, període en el que no es detecta expressió de FasL en pàncrees (130). Per tant en illots de rata el sistema Fas/FasL no seria el mecanisme implicat en la inducció de mort cel·lular beta induïda per la glucosa.

Després de l'estudi de la mort cel·lular beta en aquests primers dies després del trasplantament es va estudiar si existien canvis en la replicació cel·lular beta i en la mida individual de les cèl·lules beta que poguessin contribuir en aquesta pèrdua inicial de massa beta. Es ben conegut que la glucosa és un important estimulador de la replicació de les cèl·lules beta tant per estudis *in vitro* d'illots adults i fetals (336,338) com *in vivo* en illots pancreàtics (35) i trasplantats (11,12,153,228,229). En illots trasplantats concretament s'havia descrit un augment de la replicació de les cèl·lules beta després de 14 dies d'hiperglicèmia (223), per tant s'esperava que el grup hiperglicèmic presentés un augment de la replicació respecte el grup tractat amb insulina. En canvi 3 dies després del trasplantament hem demostrat que la replicació beta no està augmentada en els empelts exposats a hiperglicèmia respecte la dels animals tractats amb insulina. El disseny de l'estudi va permetre descartar la possibilitat que la limitació de la replicació de les cèl·lules beta fos deguda al lloc inadequat d'implantació dels illots, a limitacions genètiques de la soca de ratolí o a una capacitat replicativa reduïda dels illots trasplantats. S'ha descrit prèviament que l'espai subcapsular renal ofereix les millors condicions de creixement pels illots trasplantats de ratolí (218). A més a més no s'han descrit limitacions genètiques en la replicació de les cèl·lules beta en els ratolins C57Bl/6 (339) que s'utilitzaven com a donants i receptors del trasplantament. Finalment la replicació de les cèl·lules beta està preservada en illots trasplantats, com s'ha demostrat en estudis previs (223) i en aquest mateix en observar un augment de la replicació en els empelts del grup hiperglicèmic 10 dies després del trasplantament. Per tant és possible que en aquests primers dies existeixi un factor que limiti l'augment de la replicació de les cèl·lules beta i que no permeti compensar la pèrdua de massa beta amb un augment de la replicació cel·lular beta. Per altra banda un altre dels mecanismes implicats en la regulació de la massa beta és l'àrea individual de les cèl·lules beta. En aquests primers dies després del

trasplantament l'àrea individual beta no va presentar canvis que contribuïssin en aquesta pèrdua inicial de massa beta trasplantada. Tots aquests resultats demostren que es principalment l'augment en la mort cel·lular beta el responsable de la pèrdua inicial de massa beta després del trasplantament.

A més de l'estudi inicial després del trasplantament, es realitzà un seguiment de l'evolució de la massa beta dels animals trasplantats. Deu dies després la massa beta va augmentar en empelts d'animals hiperglicèmics, mantenint-se sense canvis la reducció en empelts d'animals tractats amb insulina. L'apoptosi beta va mantenir-se augmentada en els dos grups i la necrosi era indetectable. En els empelts del grup tractat amb insulina quan encara rebien el tractament, el manteniment de l'apoptosi beta elevada podia ser degut a diferents factors. Primer, deu dies després del trasplantament els implants d'insulina aportaven la insulina necessària pel manteniment de la normoglicèmia i els illots trasplantats no eren necessari; el manteniment de l'apoptosi elevada per tant podria evitar l'augment de la massa beta i el potencial risc d'hipoglicèmies per una massa beta excessiva en aquests animals. Aquesta regulació de la massa beta mitjançant la mort per apoptosi s'ha estat descrita en altres models com el de trasplantament d'insulinomes (33). El trasplantament d'insulinomes a rates singèniques provoca una disminució de la massa beta degut un procés d'apoptosi de les cèl·lules beta endògenes. S'havia suggerit que el fet que els animals patissin hipoglicèmies, degut a les cèl·lules beta del pàncrees i als insulinomes implantats, podria ser clau en el procés de reducció de la massa beta (33). Aquestes dades permeten hipotetitzar que la hipoglicèmia moderada d'alguns animals del nostre estudi tractats amb insulina podria haver contribuït a l'increment de l'apoptosi beta.

Les diferències en la massa beta observades entre el grup hiperglicèmic i tractat amb insulina van ser degudes a l'augment de la replicació (hiperplàsia) i de l'àrea individual de les cèl·lules beta (hipertròfia) exposades a 10 dies d'hiperglicèmia. Aquests resultats són coincidents amb altres estudis com els realitzats amb animals no-diabètics trasplantats i exposats a un augment en la demanda metabòlica com una pancreatectomia parcial. Davant l'augment de la demanda metabòlica les cèl·lules beta trasplantades presentaven un increment de la replicació i mida, conduint a un augment de la massa beta

(229). Per tant una hiperglicèmia mantinguda de forma transitòria sembla que pot tenir efectes beneficiosos sobre la massa beta trasplantada.

El seguiment de l'evolució de la massa beta dels animals trasplantats es va continuar trenta dies després del trasplantament, moment en el que l'empelt es troba ja ben implantat i revascularitzat. La massa beta dels animals tractats amb insulina va augmentar després de la retirada del tractament amb insulina degut a l'augment de la demanda metabòlica. L'apoptosi beta en aquests empelts havia tornat als nivells bassals dels illots de pàncrees d'animals control i estava reduïda respecte l'apoptosi a empelts d'animals hiperglicèmics. Estudis previs havien suggerit que els illots trasplantats podien presentar característicament un augment en l'apoptosi beta (69), però els nostres resultats indiquen que l'apoptosi beta no està augmentada *per se* en els illots trasplantats. A més a més de la reducció de l'apoptosi beta a valors fisiològics, a l'augment de la massa beta després de la retirada del tractament amb insulina el dia 10 probablement va contribuir-hi un augment de la replicació (hiperplàsia) transitori i un augment de la mida individual de les cèl·lules beta davant la nova demanda metabòlica, ja que a partir d'aquell moment els illots eren els responsables del manteniment de la normoglicèmia. Els nivells normals d'apoptosi, la hiperplàsia transitòria i un augment de la mida individual de les cèl·lules beta observat el dia 30 després del trasplantament va comportar l'expansió de la massa beta en aquests animals. Per contra la massa beta dels empelts exposats a hiperglicèmia crònica es va reduir de forma important trenta dies després del trasplantament. L'apoptosi beta es va mantenir augmentada i la replicació de les cèl·lules beta, augmentada després de 10 dies d'hiperglicèmia, es va reduir a valors propers de normoglicèmia davant d'aquesta hiperglicèmia sostinguda no podent contrarestar la mort per apoptosi. Aquests dades confirmen uns resultats previs obtinguts a cèl·lules beta trasplantades exposades a 18-30 dies d'hiperglicèmia que suggerien que la hiperglicèmia sostinguda tenia un efecte deleteri en la capacitat replicativa de la cèl·lula beta (223,230,236). A més en els empelts exposats a hiperglicèmia crònica no es va continuar produint l'augment de la mida cel·lular beta, identificat en empelts exposats a hiperglicèmia de forma transitòria. En un model animal de Diabetis tipus 2 amb la rata del desert *Psammomys obesus*, s'ha demostrat també que la

hiperglicèmia crònica conduïa a una progressiva pèrdua de la massa beta degut a la inducció de la mort de cèl·lules beta sense un suficient augment en l'índex de producció de noves cèl·lules beta (78). Els resultats obtinguts confirmen la hipòtesi que l'augment en l'apoptosi de les cèl·lules beta condueix a una disminució de la massa beta a illots trasplantats exposats a hiperglicèmia crònica.

En aquest estudi hem aportat la primera evidència que l'exposició a hiperglicèmia greu de forma crònica condueix a un augment en la mort cel·lular beta per apoptosi en animals no genèticament predisposats a la diabetis, com és el ratolí C57Bl/6. No es coneix amb exactitud quins són els possibles mediadors del dany sobre les cèl·lules beta induït en hiperglicèmia crònica. Una de les hipòtesis que ens vam plantejar va ser la possibilitat que els animals del grup hiperglicèmic presentessin uns nivells d'àcids grassos elevats, degut al deteriorament de l'estat metabòlic d'aquests animals. S'havia descrit que l'exposició a nivells elevats d'àcids grassos de forma crònica podia ser tòxica i hi havia evidències de què podia causar la mort de les cèl·lules beta (174). En mesurar els nivells d'àcids grassos lliures en aquests animals no es van detectar diferències entre els animals hiperglicèmics trenta dies després del trasplantament i els animals control, indicant que els àcids grassos lliures no jugarien un paper en aquest augment de la mort cel·lular beta.

S'han proposat diferents mecanismes que podrien explicar aquest augment de la mort cel·lular beta en hiperglicèmia crònica. En diabetis s'ha descrit que les cèl·lules beta estan exposades a fructosa durant un llarg període de temps, un sucre amb una gran capacitat reductora, provocant un deteriorament gradual de la seva funció. Es creu que principalment els sucres reductors causen dany degut a la formació d'espècies reactives d'oxigen (ROS) en reaccions de glicosilació o degut a una inhibició dels mecanismes d'eliminació de ROS. A més s'ha demostrat que en diabetis hi ha una disminució de les activitats d'enzims antioxidants com la superòxid dismutasa i la GSH peroxidasa (247,383). Per tant aquest estrès oxidatiu provocat principalment per les reaccions de glicosilació podria explicar el dany sobre les cèl·lules beta en hiperglicèmia crònica. Per altra banda es coneix que els productes finals de reaccions de glicosilació (AGEs) alteren la funció de les cèl·lules beta (340), afectant la funció de molècules involucrades en la

secreció d'insulina, la transcripció i la transducció de proteïnes, i probablement podrien afectar el procés apoptòtic, el qual requereix síntesi *de novo* de proteïnes. Per altra banda s'ha descrit que la quantitat de *O*-GlcNAc a cèl·lules beta, un monosacàrid que s'uneix a proteïnes intracel·lulars, augmenta de forma marcada en resposta a hiperglicèmia. Hi ha evidències que demostren que la modificació de factors de transcripció degut a la unió de *O*-GlcNAc pot alterar la seva estabilitat (129, 332) i unió en la transcripció (293). En l'apoptosi induïda per STZ a cèl·lules beta es va observar que es produïa el bloqueig de l'activitat encarregada d'eliminar *O*-GlcNAc (189), suggerint un paper de la acumulació dels *O*-GlcNAc en la inducció de l'apoptosi.

Per altra banda també és possible que la manca d'un factor de supervivència en hiperglicèmia crònica com la insulina contribueixi a l'augment de la mort cel·lular beta trenta dies després del trasplantament. S'ha descrit que els illots trasplantats exposats a hiperglicèmia crònica pateixen una reducció greu del contingut d'insulina (223) i una disminució de la transcripció del gen de la insulina (279). Un estudi recent ha proposat 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 (251a). El cultiu d'illots humans durant cinc dies amb insulina reduïa el nombre de nuclis apoptòtics presents en les preparacions. Per tant el fet que els empelts d'illots exposats a hiperglicèmia crònica presentin uns nivells d'insulina baixos podria ser una de les causes d'aquest augment de la mort per apoptosi únicament en els empelts dels animals hiperglicèmics trenta dies després del trasplantament.

El fenomen en què un empelt fracassa i no arriba a ser funcional abans de l'inici del procés de rebuig es conegut com no funció primària. El concepte de no funció primària està associat a una manca de funcionalitat de l'empelt, tant per problemes de funció com per pèrdua de les cèl·lules beta de l'empelt després del trasplantament (29). Aquest fenomen de no funció primària s'ha descrit a trasplantaments d'illots singènics, a més de a trasplantaments al·logènics, indicant que fenòmens diferents al rebuig i l'autoimmunitat estarien involucrats en la pèrdua primerenca de l'empelt després del trasplantament. S'ha suggerit que la presència d'una inflamació no-específica en el lloc d'implantació dels illots

podria ser una de les causes d'aquesta pèrdua primerenca de l'empelt (29). Aquesta inflamació no-específica podria ser deguda a la hipòxia que pateix l'empelt en aquests primers dies després del trasplantament i/o a l'exposició a un microambient no favorable en el lloc d'implantació dels illots (237). Els illots trasplantats estarien exposats a citocines i radicals lliures produïts per cèl·lules activades davant aquesta inflamació no-específica, com els macròfags.

La IL-1 β és una citocina pro-inflamatòria coneguda pels seus efectes tòxics sobre les cèl·lules de l'illot (205) i el NO també s'ha descrit que pot induir la destrucció de les cèl·lules beta (168a). Es ben conegut que la IL-1 β indueix l'expressió del gen iNOS a illots i a línies d'insulinomes de rata (95,156). S'ha descrit que l'exposició a IL-1 β sola o en combinació amb IFN- γ indueix un pic d'expressió de iNOS en illots de rata en cultiu després de 6 h d'exposició, disminuint posteriorment a les 24 h d'exposició a les citocines (87). Un cop demostrat l'augment de la mort cel·lular i la pèrdua de massa beta en aquests primers dies després del trasplantament, l'estudi de l'expressió dels gens de la IL-1 β i de l'enzim encarregat de la síntesi de NO, concretament l'enzim induïble per citocines, iNOS, ens permetria investigar la presència d'un possible mecanisme d'inducció de la mort cel·lular beta in vivo. L'augment d'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS podia suggerir la inducció per part de la IL-1 β de l'expressió del gen iNOS, resultant finalment en l'augment de la mort cel·lular beta aquests primers dies després del trasplantament. La correlació significativa que hem identificat entre l'expressió dels dos gens, suggereix que l'expressió de IL-1 β està involucrada en l'augment d'expressió del gen iNOS. El nostre estudi demostra l'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS en illots de rata ja immediatament després de l'aïllament i el seu augment en empelts els primers dies post-trasplantament. A més hem identificat que un menor augment de l'expressió dels dos gens en empelts d'animals hiperglicèmics respecte els normoglicèmics, suggerint que la hiperglicèmia limitaria l'augment d'expressió.

Hem detectat l'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS ja en illots frescos després de l'aïllament. La presència de mRNA de IL-1 β i iNOS en illots frescos suggereix que l'inici del procés inflamatori es produeix ja durant l'aïllament. Es coneix que els nivells

alts d'activitat endotoxina presents en les preparacions de col·lagenasa comercial, enzim utilitzat en el procés d'aïllament dels illots, condueix a la producció de citocines pro-inflamatòries per part de cèl·lules de la línia macròfag-monocit in vitro (147,351). Recentment, a més s'ha descrit l'expressió i la producció de citocines com la IL-1, IL-6 i TNF- α en illots humans després de l'aïllament (251a). Aquesta inducció de l'expressió dels gens en l'aïllament dels illots podria contribuir a la destrucció de les cèl·lules de l'illot que hem observat en els primers dies després del trasplantament.

L'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS en illots trasplantats està augmentada respecte els illots frescos. L'expressió del gen de la IL-1 β va augmentar 3 vegades en empelts d'animals hiperglicèmics i 9 vegades en empelts d'animals tractats amb insulina en comparació amb els illots frescos. Per altra banda l'expressió del gen iNOS va augmentar 5 vegades en empelts d'animals hiperglicèmics i 14 vegades en empelts d'animals tractats amb insulina respecte els illots frescos. A més del procés iniciat en l'aïllament hi ha diferents factors que poden estar implicats en la inducció de l'expressió dels dos gens després del trasplantament. Els illots perden les connexions vasculars durant el procés d'aïllament i la revascularització dels illots no es produeix fins els dies 7-10 després del trasplantament (221), fet que comporta que aquests primers dies després del trasplantament els illots depenguin de la difusió dels nutrients i de l'oxigen de la perifèria de l'illot i pateixin hipòxia. S'ha descrit en diferents tipus cel·lulars que la hipòxia pot produir mediadors proinflamatoris capaços d'augmentar l'expressió de gens inflamatoris com els de la IL-1 β , IL-8 o TNF- α (384). Per altra banda es creu que la hipòxia pot inhibir la producció de NO, però que no afectaria la transcripció del mRNA de iNOS (136). Així doncs la hipòxia podria induir l'augment d'expressió de la IL-1 β en els empelts 1 i 3 dies després del trasplantament, període en què els illots encara no estan revascularitzats. L'augment de l'expressió de citocines pro-inflamatòries també s'ha descrit en resposta a dany durant el trasplantament (250). Durant el procés d'aïllament i trasplantament les cèl·lules trasplantades poden patir danys, fet que podria provocar una inflamació conduint a l'activació de macròfags. Es coneix que els macròfags activats produeixen i secreten citocines pro-inflamatòries com IL-1, a més d'altres mediadors com el NO (17). Hi ha pocs estudis sobre l'expressió de citocines a empelts d'illots en aquests primers dies

després del trasplantament. En un model de trasplantament al·logènic a ratolí es va descriure l'expressió de les citocines pro-inflamatòries IL-1 β , IFN- γ i TNF- α , a més de l'expressió de iNOS dos dies després del trasplantament, moment en el qual encara no s'havia iniciat el procés de rebuig, suggerint que aquesta expressió probablement era deguda a un procés d'inflamació no-específica que tindria lloc els primers dies després del trasplantament (127). En l'únic estudi sobre l'expressió de citocines en un model singènic de trasplantament en rata es va detectar la presència, ja en preparacions d'illots frescos, de IL-1 α , IL-6 i IFN- γ abans del trasplantament i es va observar una expressió inicial de les citocines pro-inflamatòries IL-1 α i IL-6 en empelts d'illots (250). Es coneixia que la IL-1 podia induir l'expressió d'una altra citocina pro-inflamatòria, el TNF- α , directament a cèl·lules beta (380), i el TNF- α produït a la vegada podria produir un efecte inhibitori sobre la funció de les cèl·lules beta (Rabinovitch4). S'havia descrit una important regulació post-transcripcional dels nivells de TNF- α , per tant les dades de mRNA serien poc informatives i per aquesta raó no s'ha estudiat l'expressió del TNF- α (30). L'expressió de IL-6 després del trasplantament d'illots s'ha correlacionat amb una producció en resposta a un trauma, conclusió que també es va proposar en estudis d'empelts al·logènics vascularitzats (68). El dany que poden patir les cèl·lules trasplantades durant l'aïllament i el trasplantament i la hipòxia que pateixen els illots després del trasplantament podrien contribuir a la inducció de l'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS, conduint a un procés d'inflamació no específica que podria estar implicat en la destrucció cel·lular beta en els primers dies després del trasplantament.

No coneixem quin és el tipus cel·lular responsable de l'expressió de IL-1 β i iNOS. Després de 1 i 3 dies del trasplantament les potencials fonts cel·lulars de IL-1 β i iNOS són les cèl·lules endocrines i algunes de no-endocrines presents a l'illot com fibroblasts, cèl·lules endotelials i macròfags. Dins de les cèl·lules endocrines s'ha descrit que les cèl·lules beta de rata poden expressar IL-1 β i iNOS. Recentment, s'ha publicat que la doble cadena de RNA que es formaria durant la infecció viral, factor que pot iniciar el dany sobre les cèl·lules beta durant el desenvolupament de la diabetis autoimmune, estimula la producció de IL-1 a cèl·lules beta d'illots de rata (133). Un altre estudi ha

demostrat que les cèl·lules beta humanes poden produir IL-1 β en resposta a glucosa independentment de l'existència d'una infecció viral o un procés autoimmune com en la diabetis mellitus (202). A més es coneix que el cultiu d'illots de rata amb IL-1 β estimula l'expressió de iNOS i la producció de NO en cèl·lules beta (331). Per tant les cèl·lules beta podrien participar tant en l'expressió del gen de la IL-1 β com de iNOS. En relació a les cèl·lules no-beta de l'illot s'ha descrit que les cèl·lules alfa, productores de glucagó, no produeixen IL-1 β en un model de diabetis induïda per ciclofosfamida en ratolí NOD, mentre sí que ho fan les cèl·lules beta, macròfags i cèl·lules delta, productores de somatostatina (281). Per altra banda s'ha observat que l'exposició d'illots de rata a IL-1 β no indueix la producció de NO a cèl·lules alfa (331). Per tant la participació de les cèl·lules no-beta en l'expressió de IL-1 β i iNOS en les condicions estudiades no pot ser descartada.

Per altra banda en relació a la producció de la IL-1 β i iNOS per cèl·lules no endocrines els potencials productors de la IL-1 β i iNOS serien els fibroblasts, les cèl·lules endotelials i els macròfags. Els fibroblasts normalment es troben formant una capa prima al voltant dels illots, que es perd durant l'aïllament (17), suggerint que els fibroblasts molt probablement no jugarien un paper en l'expressió de la IL-1 β i iNOS en aquests primers dies després del trasplantament.

En relació a les cèl·lules endotelials, les quals constitueixen el 10% de les cèl·lules de l'illot (~150/illot) (18), no es coneix quin és el seu destí després de l'aïllament degut a la pèrdua de les connexions vasculars, però és probable que un dia després del trasplantament encara es mantinguin a l'empelt. Es ben conegut que les cèl·lules endotelials secreten factors de creixement i citocines, els quals poden contribuir a processos d'angiogènesi (26), però també de mort cel·lular. A més en estudis *in vitro* s'ha descrit que la combinació de citocines (IL-1 β , TNF- α i IFN- γ) indueix l'expressió de mRNA de iNOS (333a) a cèl·lules endotelials dels capil·lars dels illots. Per tant les cèl·lules endotelials podrien participar en l'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS en aquests primers dies després del trasplantament.

Entre les cèl·lules de l'illot existeixen macròfags residents, uns 5-15/illot (17,18). Malgrat que constitueixen una petita quantitat de les cèl·lules de l'illot, diferents estudis

han mostrat que l'activació dels macròfags residents a illots de rata condueix a una producció local d'uns nivells de IL-1 suficients per estimular l'expressió de iNOS i la producció de NO (18). En un cultiu d'illots de rata en un medi amb TNF i LPS, condicions clàssiques utilitzades per activar els macròfags, es va observar la inducció de l'expressió de mRNA de IL-1 β i iNOS i la producció de NO. Si prèviament els illots eren cultivats durant 7 dies a 24°C, fet que provoca l'eliminació de les cèl·lules limfoides residents, no s'observava l'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS, es reduïa de forma marcada la producció de nitrit i no es produïen els efectes sobre la secreció d'insulina (18). Aquestes dades indicaven que els macròfags eren els responsables tant de l'expressió de IL-1 com de iNOS en illots de rata en aquestes condicions. Per tant podem concloure que hi haurien diferents tipus cel·lulars que podrien ser els responsables de l'expressió de la IL-1 β i iNOS, però probablement els principals responsables de l'expressió de la IL-1 β i iNOS serien les mateixes cèl·lules beta i/o els macròfags residents.

L'expressió dels gens de la IL-1 β i de iNOS estava significativament augmentada (unes 3 vegades) en els empelts del grup tractat amb insulina en comparació amb el grup hiperglicèmic després del trasplantament. Aquest fet ens va suggerir dues possibilitats: que la hipoglicèmia relativa que patien els animals tractats amb insulina podia causar l'augment d'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS o bé que la hiperglicèmia limitaria l'augment d'expressió d'aquests gens. Per estudiar la possibilitat que la hipoglicèmia dels animals tractats amb insulina fos la causant d'aquest augment d'expressió es van trasplantar animals normals no diabètics. L'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS va ser tant elevada en el grup trasplantat no diabètic com en el grup tractat amb insulina, indicant que la hipoglicèmia no era la causa de l'augment en l'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS en el grup tractat amb insulina. Descartada aquesta possibilitat els resultats semblen indicar que el menor augment en l'expressió dels gens en el grup hiperglicèmic seria degut a què la hiperglicèmia provocaria una limitació en l'augment d'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS en aquests primers dies després del trasplantament.

Dades obtingudes en un estudi recent realitzat amb illots humans i illots de la rata del desert *Psammomys obesus* han demostrat la presència d'expressió del gen i de la

proteïna IL-1 β en hiperglicèmia. El cultiu d'illots humans en un medi 33.3 mM de glucosa durant 2 dies induïa l'expressió, la síntesi i l'alliberament de IL-1 β in vitro. En aquest mateix estudi es va observar la presència de la proteïna de la IL-1 β únicament a pàncrees de pacients diabètics tipus 2 en comparació amb pàncrees control. A més el manteniment durant 8 dies de la rata del desert, *Psammomys obesus* (model de DM-2), amb una dieta rica en energia va comportar l'augment dels nivells de glicèmia i la presència de la IL-1 β a la majoria de cèl·lules beta dels illots. Quan els nivells de glucosa van ser normalitzats la presència de IL-1 β va desaparèixer (202), suggerint que els nivells elevats de glucosa eren els responsables de la inducció de l'expressió de la proteïna IL-1 β a cèl·lules beta. Les diferències en les condicions en què van ser realitzats els estudis (in vivo o in vitro) i la diferent susceptibilitat a la glucosa entre cèl·lules beta humanes i de rosegadors podrien explicar les diferències entre els resultats que hem obtingut amb illots trasplantats de rata i els resultats d'aquest grup amb d'illots humans i illots de *P.obesus* (85,201). A més de les cèl·lules beta un altre dels possibles tipus cel·lulars responsables de l'expressió de la IL-1 β i iNOS serien els macròfags. S'havia suggerit que els macròfags serien un dels tipus cel·lulars implicats en la inflamació no-específica dels primers dies després del trasplantament, els quals alliberarien diferents mediadors citotòxics com citocines proinflamatòries i NO. En diferents estudis in vitro es va descriure que els macròfags de rates diabètiques per injecció amb STZ i de ratolins diabètics per tractament amb al·loxà presentaven una alteració de la secreció de citocines i factors de creixement (78a,270). Per altra banda s'havia demostrat que a la línia de macròfags de ratolí RAW 264.7 l'alliberament de IL-1 era màxim en un medi de cultiu amb una concentració de glucosa entre 2-6 mM, però que s'inhibia a concentracions més altes (8-20 mM) (135a). Per tant la funció dels macròfags es trobava alterada davant l'exposició a altes concentracions de glucosa, fet que obre la possibilitat que altres funcions com l'expressió gènica es trobin afectades en hiperglicèmia.

L'existència d'una correlació significativa entre els resultats d'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS suggereix que l'expressió del gen de la IL-1 β estaria involucrat en l'augment de l'expressió del gen iNOS. Aquest fet permet indicar la presència d'un

mecanisme de mort cel·lular beta via la inducció de l'expressió de la IL-1 β i iNOS. S'ha descrit que l'exposició d'illots de rata en cultiu a IL-1 β comporta la disminució de la supervivència de les cèl·lules beta (208,214,298), degut a un augment de la mort cel·lular beta tant per apoptosi, observant-se la fragmentació del DNA característica de l'apoptosi (273), com per necrosi principalment via la inducció de la producció de NO per part de la IL-1 β (187, 386). Per tant l'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS en aquests primers dies després del trasplantament pot haver participat en la inducció de la mort cel·lular beta observada en aquests primers dies. Per altra banda, però, en empelts exposats a hiperglicèmia hem demostrat un menor augment en l'expressió de IL-1 β i iNOS després del trasplantament respecte dels normoglicèmics tractats amb insulina. Això era així malgrat que l'apoptosi beta estava més augmentada en illots trasplantats de rata exposats a hiperglicèmia. Aquesta discordança no pot ser explicada fàcilment, però existeixen diferents possibilitats que podrien explicar aquest fet. Tant la IL-1 β com el NO causen dany sobre les cèl·lules beta, però altres factors a més de la IL-1 β i el NO poden haver contribuït a l'augment de la mort inicial després del trasplantament. En els empelts d'animals hiperglicèmics pot haver-hi una menor expressió de gens que confereixin protecció contra la mort cel·lular beta induïda per IL-1 β i NO respecte l'expressió en empelts tractats amb insulina. En aquest sentit en animals amb una pancreatectomia del 90 % que presenten una hiperglicèmia moderada s'ha descrit una reducció en l'expressió del gen Bcl-2, gen anti-apoptòtic, del voltant del 20% respecte els animals controls 4 setmanes després de la pancreatectomia (172a). Una menor expressió de gens protectors o anti-apoptòtics en els empelts d'animals hiperglicèmics podria conduir a l'augment de mort per apoptosi en aquests animals en comparació amb els empelts d'animals normoglicèmics malgrat el menor augment en l'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS. A més hem determinat només els nivells de mRNA dels gens de la IL-1 β i iNOS i no els de proteïna, la existència d'una regulació post-transcripcional i del procés de traducció a proteïna (359) pot conduir a què els nivells de missatger obtinguts no equivalguin als nivells finals de proteïna. Per tant la IL-1 β i NO poden estar implicats en la mort cel·lular beta, però el balanç final de tot un conjunt de factors conduirà a una inducció o a una inhibició d'aquesta mort cel·lular.

L'augment de la mort cel·lular beta és el principal responsable de la pèrdua inicial de massa beta després del trasplantament, però la limitació en la capacitat de compensar aquesta pèrdua mitjançant l'augment de la replicació beta en els empelts exposats a hiperglicèmia també hi podria tenir un paper. La IL-1 β podria estar implicada en la limitació de la replicació de les cèl·lules beta observada davant la hiperglicèmia transitòria en els empelts d'animals hiperglicèmics tres dies després del trasplantament. Després de 14 dies d'hiperglicèmia s'ha descrit un augment de la replicació de les cèl·lules beta en illots trasplantats (223), augment que no hem observat en illots trasplantats exposats a 3 dies d'hiperglicèmia. Es coneix que la IL-1 β inhibeix la replicació de les cèl·lules beta a illots fetals de rata i a cèl·lules RINm5F (300,315). Així doncs la presència de l'expressió del gen de la IL-1 β obriria la possibilitat d'un possible paper de la IL-1 β limitant la replicació de les cèl·lules beta en els empelts exposats a hiperglicèmia.

La insuficient quantitat de teixit insular destinat a la realització de trasplantaments és un dels principals obstacles pel trasplantament d'illots, a més el problema es veu agreujat per el gran nombre d'illots necessaris per realitzar un trasplantament amb èxit. Hem demostrat la presència d'una important pèrdua de massa beta en els primers dies després del trasplantament deguda a processos de mort per apoptosi i necrosi que podria contribuir a l'elevada necessitat d'una major quantitat d'illots a trasplantar. Degut a la manca de teixit a trasplantar és essencial estudiar els mecanismes involucrats en l'augment d'aquesta mort cel·lular beta inicial per tenir un millor coneixement dels processos que tenen lloc en aquests primers dies que permetin reduir la destrucció de l'empelt i millorar el pronòstic del trasplantament. En aquest sentit la demostració de la presència de IL-1 β i iNOS en els empelts en aquests primers dies després del trasplantament probablement ofereixi un ventall de possibilitats per a desenvolupar estratègies que permetin millorar la supervivència dels illots trasplantats.

CONCLUSIONS

- 1) En els primers dies després del trasplantament es produeix una pèrdua de més de la meitat de la massa beta trasplantada no relacionada amb processos de rebuig ni autoimmunitaris. La pèrdua de massa cel·lular beta es produeix tant en condicions d'hiperglicèmia com de normoglicèmia, indicant que les millors condicions metabòliques del receptor no permeten reduir aquesta pèrdua.
- 2) En els primers dies després del trasplantament es produeix un augment en la mort cel·lular beta tant per processos d'apoptosi com de necrosi. Per altra banda, no es produeixen canvis en la replicació ni en la mida de les cèl·lules beta, indicant que aquests processos no juguen un paper en la reducció de la massa beta trasplantada.
- 3) Les condicions metabòliques del receptor no modifiquen l'apoptosi de les cèl·lules beta en els primers dies després del trasplantament en illots de ratolí. Per contra en illots de rata, la hiperglicèmia indueix un major augment de l'apoptosi en cèl·lules beta, indicant l'existència de diferències en la sensibilitat a la glucosa entre espècies diferents.
- 4) En els primers dies després del trasplantament les cèl·lules beta exposades a hiperglicèmia no mostren un augment de la replicació, suggerint l'existència d'una limitació en la capacitat de replicació en aquest període.
- 5) L'exposició a hiperglicèmia per un període de 10 dies resulta en l'augment de la massa beta trasplantada degut a un increment en la replicació i la mida cel·lular beta, suggerint que l'exposició transitòria a hiperglicèmia pot tenir efectes beneficiosos sobre la cèl·lula beta.
- 6) Els illots trasplantats exposats a hiperglicèmia crònica (30 dies) presenten un augment de la mort per apoptosi de les cèl·lules beta i una reducció en la massa beta trasplantada, demostrant els efectes deleteris de l'exposició a hiperglicèmia de forma sostinguda. Per contra els animals normoglicèmics presenten uns nivells baixos

d'apoptosi similars als del pàncrees d'animals control, indicant que l'apoptosi beta no està augmentada per se en els illots trasplantats.

- 7) En els primers dies després del trasplantament l'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS augmenta respecte l'expressió en els illots abans del trasplantament, suggerint que es produeixen fenòmens inflamatoris que participen en l'augment de mort cel·lular observada.
- 8) Els illots trasplantats exposats a hiperglicèmia presenten un menor augment en l'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS en comparació amb els illots trasplantats a receptors normoglicèmics, suggerint que es produeix una limitació en l'augment d'expressió dels gens de la IL-1 β i iNOS en empelts exposats a hiperglicèmia.

BIBLIOGRAFIA

1. Accili D: A kinase in the life of the β -cell. *The Journal of Clinical Investigation* 2001;108:1575-1576.
2. Adams JM, Cory S: The Bcl-2 protein family: arbiters of the cell survival. *Science* 1998;281:1322-1326.
3. Ahlgren U, Jonsson J, Edlund H: Arrested development of the pancreas in IPF1/PDX1 deficient mice reveals that the pancreatic mesenchyme develops independently of the pancreatic epithelium. *Development* 1996;122:1409-1416.
4. Alejandro R, Cutfield RG, Shienvold FL, Polonsky KS, Noel J, Olson L, et al.: Natural history of intrahepatic canine islet cell autografts. *Journal of Clinical Investigation* 1986;78(5):1339-1348.
5. Alm P, Ekstrom P, Henningsson R, Lundquist I: Morphological evidence for the existence of nitric oxide and carbon monoxide pathways in the rat islets of Langerhans: an immunocytochemical and confocal microscopical study. *Diabetologia* 1999;42:978-986.
6. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, et al.: Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87:171.
7. Amrani A, Verdaguer J, Anderson B, Utsugi T, Bou S, Santamaria P: Perforin-independent β -cell destruction by diabetogenic CD8⁺ T lymphocytes in transgenic nonobese diabetic mice. *Journal of Clinical Investigation* 1999;103:1201-1209.
8. Amrani A, Verdaguer J, Thiessen S, Bou S, Santamaria P: IL-1 α , IL-1 β and IFN- γ mark β -cells for Fas-dependent destruction by diabetogenic CD4⁺ T lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation* 2000;105:459-468.
9. Andersen HU, Jørgensen KH, Egeberg J, Mandrup-Poulsen T, Nerup J: Nicotinamide prevents interleukin-1 effects on accumulated insulin release and nitric oxide production in rat islets of Langerhans. *Diabetes* 1994;43:770-777.
10. Andersson AK, Flodstrom M, Sandler S: Cytokine-induced inhibition of insulin release from mouse pancreatic beta-cells deficient in inducible nitric oxide synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001;281:396-403.
11. Andersson A, Korsgren O, Naeser P: DNA replication in transplanted and endogenous pancreatic islets of obese-hyperglycemic mice at different stages of the syndrome. *Metabolism* 1988;38:974-978.
12. Andersson A: On the factors that regulate growth of transplanted islets. *Journal of Autoimmunity* 1990;3:131-136.

13. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Brüne B, Nicotera P: Interleukin-1 β -induced nitric oxide production activates apoptosis in pancreatic RINm5F cells. *Experimental Cell Research* 1994;212:172-177.
14. Antonsson B, Martinou JC: The Bcl-2 protein family. *Experimental Cell Research* 2000;256:50-57.
15. Arai K-I, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T: Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annual Review of Biochemistry* 1990;59:783-836.
16. Arita S, Une S, Atiya A, Kasraie A, Shevlin L, Mullen Y: Prevention of primary islet isograft nonfunction in mice with pravastatin. *Transplantation* 1998;65:1429-1433.
17. Arnush M, Heitmeier MR, Scarim AL, Marino MH, Manning PT, Corbett JA: IL-1 produced and released endogenously within human islets inhibits beta cell function. *Journal of Clinical Investigation* 1998;102:516-526.
18. Arnush MA, Scarim AL, Heitmeier MR, Kelly CB, Corbett JA: Potencial role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes. *Journal of Immunology* 1998;160:2684-2691.
19. Ashcroft SJ: Glucoreceptor mechanisms and the control of insulin release and biosynthesis. *Diabetologia* 1980;18:5-15.
20. Ashcroft FM, Proks P, Smith PA, Ammala C, Bokvist K, Rorsman P: Stimulus-secretion coupling in pancreatic beta cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 1994;55:54-65.
21. Auron PE: The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytokine Growth Factor Review* 1998;9:221-237.
22. Avruch J: Small GTPases and (serine/threonine) protein kinase cascades in insulin signal transduction. In: *A Fundamental and Clinical Text*; LeRoith D, Olefsky J, Taylor S, Ed. JP Lippincott Co., USA, 1996.
23. Bach JF, Mathis D: 70th forum in immunology: the NOD mouse. *Research in Immunology* 1997;148:281-370.
24. Ballinger WF, Lacy PE: Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 1972;72:175-86.

25. Beg AA, Vinco TS, Nanermet PV, Baldwin ASJr: Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation. *Molecular and Cellular Biology* 1993;13:3301-3310.
26. Beger C, Cirulli V, Vajkoczy P, Halban PA, Menger MD: Vascularization of purified pancreatic islet-like cell aggregates (pseudoislets) after syngeneic transplantation. *Diabetes* 1998;47:559-565.
27. Bell RC, Khurana M, Ryan EA, Finegood DT: Gender differences in the metabolic response to graded numbers of transplanted islets of Langerhans. *Endocrinology* 1994;135:2681-2687.
28. Bendtzen K, Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Nielsen JH, Dinarello CA, Svenson M: Cytotoxicity of human p17 interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans. *Science* 1986;232:1545-1547.
29. Berney T, Damris Molano R, Cattan P, Pileggi A, Vizzardelli C, Oliver R, et al.: Endotoxin-mediated delayed islet graft function is associated with increased intra-islet cytokine production and islet cell apoptosis. *Transplantation* 2001;71:125-132.
30. Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A: Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 1986;232:977-978.
31. Biarnés M, Montolio M, Nacher V, Raurell M, Soler J, Montanya E: β -cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes* 2002;51:66-72.
32. Birnbaum MJ: Turning down insulin signaling. *Journal of Clinical Investigation* 2001;108:655-659.
33. Blume N, Skouv J, Larsson LI, Holst JJ, Madsen OD: Potent inhibitory effects of transplantable rat glucagonomas and insulinomas on the respective endogenous islet cells are associated with pancreatic apoptosis. *Journal of Clinical Investigation* 1995;96:2227-2235.
34. Bonner-Weir S: Islet growth and development in the adult. *Journal of Molecular Endocrinology* 2000;24:297-302.
35. Bonner-Weir S, Deery D, Leahy JL, Weir GC: Compensatory growth of pancreatic β -cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes* 1989;38:49-53.
36. Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE: A second pathway for regeneration of the adult exocrine and endocrine pancreas: a possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 1993;42:1715-1720.

37. Bonner-Weir S, Smith FE: Islet cell growth and the growth factors involved. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 1994;5:60-64.
38. Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tarkiewicz K, Song K-H, Sharma A, et al.: In vivo cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2000;97:7999-8004.
39. Bonner-weir S, Orci L: New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes* 1982;31:883-889.
40. Bonner-Weir S: Perspective: postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology* 2000;141:1926-1929.
41. Bonner-Weir S, Scaglia L, Montana E, Juang JH, Weir GC: β -cell reserve: compensatory mechanisms of the β -cell. In: *Diabetes* 1994; Baba S, Kaneko T, Ed. *Excerpta Medica International Congress, 1995*, p. 179-228.
42. Bottino R, Fernandez LA, Ricordi C, Lehmann R, Tsan MF, Oliver R, et al.: Transplantation of allogeneic islets of Langerhans in the rat liver: effects of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation. *Diabetes* 1998;47:316-323.
43. Brandhorst H, Brandhorst D, Brendel MD, Hering BJ, Bretzel RG: Monitoring of insulin content during human islet isolation. *Transplantation Proceedings* 1998;30:364.
44. Brange J, Langkjoer L: Insulin structure and stability. *Pharmaceutical Biotechnology* 1993;5:315-350.
45. Brayman KL, Stephanian E, Matas AJ, Schmidt W, Payne WD, Sutherland DER, et al.: Analysis of infectious complications occurring after solid-organ transplantation. *Archives of Surgery* 1992;127:38-48.
46. Bréant B, Lavergne C, Rosselin G: Cell cycle and gene expression in the insulin producing pancreatic cell line β TC1. *Diabetologia* 1990;33:586-592.
47. Brunnicardi FC, Stagner J, Bonner-Weir S, Wayland H, Kleinman R, Livingston E, et al.: Microcirculation of the islets of Langerhans. *Diabetes* 1996;45:385-392.
48. Brunstedt J, Chan SJ: Direct effect of glucose on the preproinsulin mRNA level in isolated pancreatic islets. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1982;106:1383-1389.
49. Buteau J, Roduit R, Susini S, Prentki M : Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor

- pancreatic and duodenal homeobox gene-1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia* 1999;42:856-864.
50. Cameron R, Feuer G: Apoptosis and its modulation by drugs; Ed. Springer-Verleg, Heidelberg,2000.
 51. Carlsson P-O, Liss P, Andersson A, Jansson L: Measurements of oxygen tension in native and transplanted rat pancreatic islets. *Diabetes* 1998;47:1027-1032.
 52. Cetkovic-Cvrlje M, Sandler S, Eizirik DL: Nicotinamide and dexamethasone inhibit interleukin-1 induced nitric oxide production by RINm5F cells without decreasing messenger ribonucleic acid expression for nitricoxide synthase. *Endocrinology* 1993;133:1739-1743.
 53. Chahine AA, Stoeckert C, Lau HT: Local immunomodulation to promote co-stimulatory blockade. *Clinical Transplants* 1995;9:215-218.
 54. Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, Visintin I, Flavell RA, Janeway CA, et al.: The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell* 1997;89:17-24.
 55. Chick WL: Beta cell replication in rat pancreatic monolayer culture: Effects of glucose, tolbutamide, glucocorticoids, growth hormones and glucagon. *Diabetes* 1973;22:687-693.
 56. Clark A, Wells CA, Buley ID, Cruickshank JK, Vanhegan RI, Matthews DR, et al.: Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes research* 1988;9:151-159.
 57. Clerk A, Harrison JG, Long CS, Sugden PH: Pro-inflammatory cytokines stimulate mitogen-activated protein kinase subfamilies, increase phosphorylation of c-Jun and ATF2 and upregulate c-Jun protein in neonatal rat ventricular myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 1999;31:2087-2099.
 58. Cnop M, Hannaert JC, Hoorens A, Eizirik D, Pipeleers D: Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* 2001;50:1771-1777.
 59. Comens PG, Wolf BA, Unanue ER, Lacy PE, McDaniel ML: Interleukin-1 is a potent modulator of insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* 1987;36:963-970.
 60. Corbett JA, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster JR Jr, McDaniel ML: Interleukin 1 beta induces the formation of nitric oxide by beta-cells purified from rodent islets of Langerhans: evidence for the beta-cell as a source and site of action of nitric oxide. *Journal of Clinical Investigation* 1992;90:2384-2391.

61. Corbett JA, Sweetland MA, Wang JL, Lancaster JR Jr, McDaniel ML: Nitric oxide mediates cytokine-induced inhibition of insulin secretion by human islets of Langerhans. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1993;90:1731-1735.
62. Corbett JA, Mikhael A, Shimizu J, Frederick K, Misko TP, McDaniel ML, et al.: Nitric oxide production in islets from nonobese diabetic mice: aminoguanidine-sensitive and -resistant stages in the immunological diabetic process. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1993;9:8992-8995.
63. Corbett JA, McDaniel ML: Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of beta-cells? Possible therapeutic interventions in IDDM. *Diabetes* 1992;41:897-903.
64. Corbett JA, Kwon G, Misko TP, Rodi CP, McDaniel ML: Tyrosine kinase involvement in IL-1 β -induced expression of iNOS by β -cells purified from islets of Langerhans. *American Journal of Physiology* 1994;267:C48-C54.
65. Corbett JA, McDaniel ML: Intra-islet release of IL-1 inhibits β -cell function by inducing β -cell expression of iNOS. *Journal of Experimental Medicine* 1995;181:559-568.
66. Cryns V, Yuan J: Proteases to die for. *Genes and development* 1998;12:1551-1570.

66a. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI: Apoptosis. *American Journal of Surgical Pathology* 1997;21:88-101.
67. Dallman MJ, Larsen CP, Morris PJ: Cytokine gene transcription in vascularised organ grafts: analysis using semiquantitative polymerase chain reaction. *Journal of Experimental Medicine* 1991;174:493-496.
68. Dallman MJ, Wood KJ, Hamano K, Bushell AR, Morris PJ, Wood MJ et al.: Cytokines and peripheral tolerance to alloantigen. *Immunological Reviews* 1993;133:5-18.
69. Davalli AM, Scaglia L, Zanger DH, Hollister J, Bonner-Weir S, Weir GC: Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period: dynamic changes in structure and function. *Diabetes* 1996;45:1161-1167.
70. Davies PO, Poirier C, Deltour L, Montagutelli X: Genetic reassignment of the insulin-1 (*Ins1*) gene to distal mouse chromosome 19. *Genomics* 1994;21:665-667.
71. De Graaf MPA, Wolters GHJ, van Schilgaarde R: Endothelial cells in pancreatic islets and the effect of culture. *Transplantation Proceedings* 1994;26:1171.

72. DeFronzo RA: Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Reviews* 1997;5:177-269.
73. Delaney CA, Pavlovic D, Hoorens A, Pipeleers DG, Eizirik DL: Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. *Endocrinology* 1997;138:2610-2614.
74. DeLong MJ: Apoptosis: a modulator of cellular homeostasis and disease states. *Annals of New York Academy of Sciences* 1998;842:82-90.
75. Diamond AS, Gill RG: An essential contribution of IFN gamma to CD8⁺ T cell mediated rejection of pancreatic islet allografts. *Journal of Immunology* 2000;165:247-255.
76. Dinarello CA: Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095-2147.
77. Dinarello CA: Interleukin-1. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 1997;8:253-265.
78. Donath MY, Gross DJ, Cerasi E, Kaiser N: Hyperglycemia-induced β -cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* 1999;48:738-744.

78a. Doxey DL, Nares S, Park B, Trieu C, Cutler CW, Iacopino AM: Diabetes-induced impairment of macrophage cytokine release in a rat model: potential role of serum lipids. *Life Science* 1998;63:1127-1136.
79. Dunger A, Augstein P, Schmidt S, Fischer U: Identification of interleukin 1-induced apoptosis in rat islets using in situ specific labelling of fragmented. *Journal of Autoimmunity* 1996;9:309-313.
80. Dupraz P, Cottet S, Hamburger F, Dolci W, Felley-Bosco E, Thorens B: Dominant negative MyD88 proteins inhibit interleukin-1 β /interferon- γ -mediated induction of nuclear factor κ B-dependent nitrite production and apoptosis in β -cells. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:37672-37678.
81. Duvillie B, Bucchini D, Tang T, Jami J, Paldi A: Imprinting at the mouse *Ins2* locus: evidence for cis- and trans-allelic interactions. *Genomics* 1998;47:52-57.
82. Eckhardt T, Jahr H, Federlin K, Bretzel RG: Endotoxin impairs the engraftment of rat islets transplanted beneath the kidney capsule of C57bl/6 mice. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 1996;104:A51.
83. Edlund H: Transcribing pancreas. *Diabetes* 1998;47:1817-1823.

- 83a. Efanova IB, Zaitsev SV, Zhivotovsky B, Kohler M, Efendic S, Orrenius S, et al.: Glucose and tolbutamide induce apoptosis in pancreatic beta-cells. A process dependent on intracellular Ca²⁺ concentration. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:33501-33507.
84. Efrat S, Linde S, Kofod H, Spector D, Delannoy M, Grant S, et al.: Beta-cell lines derived from transgenic mice expressing a hybrid insulin gene-oncogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1988;85:9037-9041.
85. Eizirik DL, Sandler S, Welsh N, Cetkovic-Cvrlje M, Nieman A, Geller DA, et al.: Cytokines suppress human islet function irrespective of their effects on nitric oxide generation. *Journal of Clinical Investigation* 1994;93:1968-1974.
86. Eizirik DL, Delaney CA, Green MHL, Cunningham JM, Thorpe JR, Pipeleers DG, et al.: Nitric oxide donors decrease the function and survival of human pancreatic islets. *Molecular Cell Endocrinology* 1996;118:71-83.
87. Eizirik DL, Flodstrom M, Karlens AE, Welsh N: The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 1996;39:875-890.
88. Eizirik DL, Bendtzen K, Sandler S: Short exposure of rat pancreatic islets to interleukin-1 β induces a sustained but reversible impairment in β -cell function: influence of protease activation, gene transcription, and protein translation. *Endocrinology* 1991;128:1611-1616.
89. Eizirik DL: Interleukin-1 β induces an early decrease in insulin release, (pro)insulin biosynthesis and insulin mRNA in mouse pancreatic islets by a mechanism dependent on gene transcription and protein synthesis. *Autoimmunity* 1991;10:107-113.
90. Eizirik DL, Cagliero E, Bjorklund A, Welsh N: Interleukin-1-induced expression of nitric oxide synthase in insulin-producing cells is preceded by c-fos induction and depends on gene transcription and protein synthesis. *FEBS Letters* 1993;317:62-66.
91. Eizirik DL, Welsh M, Strandell E, Welsh N, Sandler S: Interleukin-1 β depletes insulin messenger ribonucleic acid and increases the heat shock protein hsp70 in mouse pancreatic islets without impairing the glucose metabolism. *Endocrinology* 1990;127:2290-2297.
92. Eizirik DL, Strandell E, Bendtzen K, Sandler S: Functional characteristics of rat pancreatic islets maintained in culture following exposure to human interleukin 1. *Diabetes* 1988;37:916-919.

93. Eizirik DL: Interleukin-1 β induces an early decrease in insulin release, (pro)insulin biosynthesis and insulin mRNA in mouse pancreatic islets by a mechanism dependent on gene transcription and protein synthesis. *Autoimmunity* 1991;10:107-113.
94. Eizirik DL, Welsh N, Hellerström C: Predominance of stimulatory effects of interleukin-1 β on isolated human pancreatic islets. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1993;76:399-403.
95. Eizirik DL, Cagliero E, Björklund A, Welsh N: Interleukin-1 β induces the expression of an isoform of nitric oxide synthase in insulin-producing cells, which is similar to that observed in activated macrophages. *FEBS Letters* 1992;308:249-252.
96. Eizirik DL, Sandler S, Welsh N, Cetkovic-Cvrlje M, Nieman A, Geller DA, et al.: Cytokines suppress human islet function irrespective of their effects on nitric oxide generation. *Journal of Clinical Investigation* 1994;93:1968-1974.
97. Eizirik DL, Pavlovic D: Is there a role for nitric oxide in β -cell dysfunction and damage in IDDM? *Diabetes Metabolism Review* 1997;13:293-308.
98. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T: A choice of death-the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 2001;44:2115-2133.
99. Federici M, Hribal M, Perego L, Ranalli M, Caradonna Z, Perego C, et al.: High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans. A potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes* 2001;50:1290-1301.
100. Fehsel K, Jalowy A, Qi S, Burkart V, Hartmann B, Kolb H: Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide. *Diabetes* 1993;42:496-500.
101. Fernandes A, King LC, Guz Y, Stein R, Wright CV, Teitelman G: Differentiation of new insulin-producing cells is induced by injury in adult pancreatic islets. *Endocrinology* 1997;138:1750-1762.
102. Finegood DT, Scaglia L, Bonner-Weir S: Dynamics of β -cell mass in the growing rat pancreas. *Diabetes* 1995;44:249-256.
103. Finegood DT, Tzur D, Fieldus WE, McArthur MD, Dhatt D, Dunichand-Hoedel A: β -cell mass dynamics during glucose infusion. *Diabetologia* 1997;40:A120.
104. Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DER, Goetz FC, Mauer M: Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *New England Journal of Medicine* 1998;339:69-75.

105. Flodström M, Tyrberg B, Eizirik DL, Sandler S: Reduced sensitivity of inducible nitric oxide synthase-deficient mice to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 1999;48:706-713.
106. Francis PJ, Southgate JL, Wilkin TJ, Bone AJ: Expression of an islet regenerating (reg) gene in isolated rat islets: effects of nutrient and non-nutrient growth factors. *Diabetologia* 1992;35:238-242.
107. Franek F, Vomastek T, Dolikova J: Fragmented DNA and apoptotic bodies document the programmed way of cell death in hybridoma cultures. *Cytotechnology* 1992;9:117-123.
108. Frisch SM, Francis H: Disruption of epithelial cell matrix interactions induces apoptosis. *Journal of Cell Biology* 1994;124:619-626.
109. Gagliardino JJ: Fisiología del páncreas endocrino. In: Fisiología humana de Houssay; Cingolani HE, Houssay AB, Ed. El Ateneo, Buenos Aires, 2000, pp 571-592.
110. Garcia-Ocaña A, Takane KK, Syed MA, Philbrick WM, Vasavada RC, Stewart AF: Hepatocyte growth factor overexpression in the islet of transgenic mice increases beta cell proliferation, enhances islet mass, and induces mild hypoglycemia. *The Journal of Biological Chemistry* 2000;275:1226-1232.
111. German MS, Moss LG, Rutter WJ: Regulation of insulin gene expression by glucose and calcium in transfected primary islet cultures. *Journal of Biological Chemistry* 1990;265:22063-22066.
112. German M, Wang J: The insulin gene contains multiple transcriptional elements that respond to glucose. *Molecular Cell Biology* 1994;14:4067-4075.
113. Giannoukakis N, Rudert WA, Ghivizzani SC, Gambotto A, Ricordi C, Trucco M, et al.: Adenoviral gene transfer of the interleukin-1 receptor antagonist protein to human islets prevents IL-1 β -induced β -cell impairment and activation of islets cell apoptosis in vitro. *Diabetes* 1999;48:1730-1736.
114. Giddings SJ, Chirgwin J, Permutt MA: Effects of glucose on proinsulin mRNA in rats in vivo. *Diabetes* 1982;31:624-629.
115. Gilmore TD: The Rel/NF- κ B signal transduction pathway: introduction. *Oncogene* 1999;18:6842-6844.
116. Giorgi D, Bernard J-P, Rouquier S, Iovanna J, Sarles H, Dagorn J-C: Secretory pancreatic stone protein messenger RNA. *Journal of Clinical Investigation* 1989;84:100-106.

117. Goldstein MB, Davis EA Jr: The three dimensional architecture of the islets of Langerhans. *Acta Anatomica* 1968;71:161-171.
118. Golosow N, Grobstein C: Epitheliomesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis. *Developmental Biology* 1962;4:242-255.
119. Gores GJ, Hermann B, Lemasters JJ: Plasma membrane bleb formation and rupture: a common feature of hepatocellular injury. *Hepatology* 1990;11:690-698.
120. Gores PF, Sutherland DER: Pancreatic islet transplantation. Is purification necessary? *American Journal of Surgery* 1993;166:538-542.
121. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F: Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2000;97:1607-1611.
122. Gremlich S, Bonny C, Waeber G, Thorens B: Fatty acids decrease IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduce GLUT2, glucokinase, insulin, and somatostatin levels. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:30261-30269.
123. Grey ST, Arvelo MB, Hasenkamp W, Bach FH, Ferran C: A20 inhibits cytokine-induced apoptosis and nuclear factor κ B-dependent gene activation in islets. *Journal of Experimental Medicine* 1999;8:1135-1145.
124. Gross A, Yin X-M, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, et al.: Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:1156-1163.
125. Gurlo T, Kawamura K, von Granfenstein H: Role of inflammatory infiltrate in activation and effector function of cloned islet reactive nonobese diabetic CD8⁺ T cells: involvement of a nitric oxide-dependent pathway. *Journal of Immunology* 1999;163:5770-5780.
126. Guz Y, Nasir I, Teitelman G: Regeneration of pancreatic β -cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes. *Endocrinology* 2001;142(11):4956-4968.
127. Gysemans CA, Waer M, Valckx D, Laureys JM, Mikhalsky D, Bouillon R, et al.: Early graft failure of xenogeneic islets in NOD mice is accompanied by high levels of interleukin-1 and low levels of transforming growth factor- β mRNA in the grafts. *Diabetes* 2000;49:1992-1997.
128. Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VEA, Longthorne VL, Culhane AC, et al.: Apoptosis: molecular regulation of death. *European Journal of Biochemistry*

- 1996;236:1-26.
129. Han IO, Kudlow JE: Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Molecular and Cellular Biology* 1997;17:2550-2558.
130. Hanke J: Apoptosis and occurrence of Bcl-2, Bak, Bax, Fas and FasL in the developing and adult rat endocrine pancreas. *Anatomy and Embryology (Berl)* 2000;202:303-312.
131. Hanover JA, Lai Z, Lee G, Lubas WA, Sato SM: Elevated O-linked N-acetylglucosamine metabolism in pancreatic beta-cells. *Archives of Biochemistry Biophysics* 1999;362:38-45.
132. Hart GW, Greis KD, Dong LY, Blomberg MA, Chou TY, Jiang MS, et al.: O-linked N-acetylglucosamine: the "yin-yang" of Ser/Thr phosphorylation? *Nuclear and cytoplasmic glycosylation. Advances in Experimental Medicine and Biology* 1995;376:115-123.
133. Heitmeier MR, Arnush M, Scarim AL, Corbett JA: Pancreatic β -cell damage mediated by β -cell production of interleukin-1. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276:11151-11158.
134. Heller B, Wang Z-Q, Wagner EF, Radons J, Burkle J, Fehsel K, et al.: Inactivation of the poly (ADP-ribose) polymerase gene affects oxygen radical and nitric oxide toxicity in islet cells. *Journal of Biochemical Chemistry* 1995;270:11176-11180.
135. Hengartner MO: The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-776.
- 135a. Hill JR, Kwon G, Marshall CA, McDaniel ML: Hyperglycemic levels of glucose inhibit interleukin 1 release from RAW 264.7 murine macrophages by activation of protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry* 1998;273:3308-3313.
136. Hong Y, Suzuki S, Yatoh S, Mizutani M, Nakajima T, Bannai S: Effect of hypoxia on nitric oxide production and its synthase gene expression in rat smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical Research Communications* 2000;268:329-332.
137. Hoorens A, Pipeleers D: Nicotinamide protects human beta cells against chemically-induced necrosis, but not against cytokine-induced apoptosis. *Diabetologia* 1999;42:55-59.
138. Hoorens A, Van de Casteele M, Kloppel G, Pipeleers D: Glucose promotes survival of rat pancreatic beta cells by activating synthesis of proteins which suppress a constitutive apoptotic program. *Journal of Clinical Investigation* 1996;98:1568-1574.

139. Hoorens A, Stange G, Pavlovic D, Pipeleers D: Distinction between interleukin-1-induced necrosis and apoptosis of islet cells. *Diabetes* 2001;50:551-557.
140. Hughes JH, Colca JR, Easom RA, Turk J, McDaniel ML: Interleukin 1 inhibits insulin secretion from isolated rat pancreatic islets by a process that requires gene transcription and mRNA translation. *Journal of Clinical Investigation* 1990;86:856-863.
141. Inoue C, Shiga K, Takasawa S, Kitagawa M, Yamamoto H, Okamoto H: Evolutionary conservation of the insulinoma gene *rig* and its possible function. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1987;84:6659-6662.
142. Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al.: Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;388:190-195.
143. Itoh N, Imagawa A, Hanafusa T, Waguri M, Yamamoto K, Iwahashi H, et al.: Requirement of Fas for the development of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Journal of Experimental Medicine* 1997;186:613-618.
144. Jaattela M: Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Experimental Cell Research* 1999;248:30-43.
145. Jacqueminet S, Briaud I, Rouault C, Reach G, Poitout V: Inhibition of insulin gene expression by long-term exposure of pancreatic β -cells to palmitate is dependent upon the presence of a stimulatory glucose concentration. *Metabolism* 2000;49:532-536.
146. Jahn R, Sudhof TC: Membrane fusion and exocytosis. *Annual review of biochemistry* 1999;68:863-911.
147. Jahr H, Pfeiffer G, Hering BJ, Federlin K, Bretzel RG: Endotoxin mediated activation of cytokine production in human PBMCs by collagenase and Ficoll. *Journal of Molecular Medicine* 1999;77:118-120.
148. Jahr H, Hering BJ, Brandhorst H, Brandhorst D, Bretzel RG, Federlin K: Isolated human pancreatic islets in vitro activate human complement. *Transplantation Proceedings* 1995;27:3270.
149. Jansson L, Hellerström C: Stimulation by glucose of blood flow to the pancreatic islets of the rat. *Diabetologia* 1983;25:45-50.
150. Jansson L, Carlsson P-O: Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets. *Diabetologia* 2002;45:749-763.
151. Jonas J, Sharma A, Hasekamp W, Ilkova H, Patanè G, Laybutt R, et al.: Chronic

- hyperglycemia triggers loss of pancreatic β cell differentiation in a animal model of diabetes. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:14112-14121.
152. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H: Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 1994;371:606-609.
153. Juang JH, Bonner-Weir S, Wu YJ, Weir GC: Beneficial influence of glycemic control upon the growth and function of transplanted islets. *Diabetes* 1994;43:1334-1339.
154. Kadowaki T: Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models. *Journal of Clinical Investigation* 2000;106:459-465.
155. Kaneto H, Fujii J, Myint T, Miyazawa N, Islam KN, Kawasaki Y, et al.: Reducing sugars trigger oxidative modifications and apoptosis in pancreatic β -cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochemical Journal* 1996;320:855-863.
156. Karlsten AE, Andersen HU, Vissing H, Larsen PM, Fey SJ, Cuartero BG et al.: Cloning and expression of cytokine-inducible nitric oxide synthase cDNA from rat islets of Langerhans. *Diabetes* 1995;44:753-758.
157. Kaufmann JE, Irminger JC, Mungall J, Halban PA: Proinsulin conversion in GH3 cells after coexpression of human proinsulin with the endoproteases PC2 and/or PC3. *Diabetes* 1997;46:978-982.
158. Kaufman DB, Morel P, Field MJ, Munn SR, Sutherland DER: Importance of implantation site and number of islets transplanted on functional outcome following autotransplantation in a canine model. *Hormone Metabolism Research* 1990;S25:162.
159. Kaufman DB, Platt JL, Rabe FL, Dunn DL, Bach FH, Sutherland DE: Differential roles of Mac-1+ cells, and CD4+ and CD8+ T lymphocytes in primary nonfunction and classic rejection of islet allografts. *Journal of Experimental Medicine* 1990;172:291-302.
160. Kaufman DB, Rabe F, Platt JL, Stock PG, Sutherland DE: On the variability of outcome after islet allotransplantation. *Transplantation* 1988;45:1151-1153.
161. Kaufman DB, Gores PF, Field MJ, Farney AC, Gruber SA, Stephanian E, et al.: Effect of 15-deoxyspergualin on immediate function and long-term survival of transplanted islets in murine recipients of a marginal islet mass. *Diabetes* 1994;43:778-783.
162. Kawahara DJ, Kenney JS: 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* 1991;3:117-124.
163. Kenmochi T, Miyamoto M, Mullen Y. Protection of mouse islet isografts from nonspecific inflammatory damage by recipient treatment with nicotinamide and 15-deoxyspergualin. *Cell Transplantation* 1996; 5:41-47.
164. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 1972;26:239-257.
165. Keymeulen B, Teng H, Vetri M, Gorus F, Pipeleers DG: Effect of donor islet mass on metabolic normalization in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1992;35:719-724.
166. Kilpatrick ED, Robertson RP: Differentiation between glucose-induced desensitization of insulin secretion and β -cell exhaustion in the HIT-T15 cell line. *Diabetes* 1998;47:606-611.
167. Kim YH, Kim S, Kim KA, Yagita H, Kayagaki N, Kim KW, et al.: Apoptosis of pancreatic beta-cells detected in accelerated diabetes of NOD mice: no role of Fas-Fas ligand interaction in autoimmune diabetes. *European Journal of Immunology* 1999;29:455-465.
168. Knowles RG, Moncada S: Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal* 1994;298:249-258.
- 168a. Kröncke K, Kolb-Bachofen V, Berschick B, Burkart V, Holb H: Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997;236:1-9.
169. Kwon G, Corbett JA, McDaniel ML: Interleukin 1-induced fos and jun do not regulate inducible nitric oxide synthase in rat islets of Langerhans and RINm5F cells. *Endocrinology* 1996;137:825-830.
170. Lamas S, Marsden PA, Gordon KL, Tempst P, Michel T: Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1992;89:6348-6352.
171. Lang J: Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *European Journal of Endocrinology* 1999;259:3-17.
172. Lau HT, Yu M, Fontana A, Stoeckert CJ: Prevention of islet allograft rejection with engineered myoblasts expressing Fas L in mice. *Science* 1996;273:109-112.

- 172a. Laybutt DR, Kaneto H, Hasenkamp W, Grey S, Jonas JC, Sgroi DC: Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to β -cell survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes* 2002;51:413-423.
173. Leahy JL, Bumbalo LM, Chen C: Diazoxide causes recovery of beta-cell glucose responsiveness in 90% pancreatectomized diabetic rats. *Diabetes* 1994;43:173-179.
174. Lee Y, Hirose H, Zhou Y, Esser V, McGarry JD, Unger RH: Increased lipogenic capacity of the islets of obese rats. *Diabetes* 1997;46:408-413.
175. Lee SA, Park JK, Kang EK, Bae HR, Bae KW, Park HT: Calmodulin-dependent activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases contributes to c-fos expression by calcium in PC12 cells: modulation by nitric oxide. *Brain research. Molecular brain research* 2000;75:16-24.
176. Leist M, Nicotera P: The shape of cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997;236:1-9.
177. Lemasters JJ, Qian T, Bradham CA, Brenner DA, Cascio WE, Trost LC, et al.: Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *Journal of Bioenergy and Biomembranes* 1999;31:305-319.
178. Lenardo MJ, Baltimore D: NF- κ B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* 1989;58:227-229.
179. Le Roith: Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* 2001;24:588-597.
180. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J: Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94:491-501.
181. Lifson N, Kramlinger KG, Mayrand RR, Lender EJ: Blood flow to the rabbit pancreas with special reference to the islets of Langerhans. *Gastroenterology* 1980;79:466-473.
182. Lindsay RM, Smith W, Rossiter SP, McIntyre MA, Williams BC, Baird JD: N^G-Nitro-L-Arginine methyl ester reduces the incidence of IDDM in BB/E rats. *Diabetes* 1995;44:365-368.
183. Linetsky E, Bottino R, Lehman R, Alejandro R, Inverardi L, Ricordi C: Improved human islet isolation using a new enzyme blend, Liberase. *Diabetes* 1997;46:1120-1123.
184. Ling Z, In't Veld PA, Pipeleers DG: Interaction of interleukin-1 with islet beta cells: distinction between indirect, aspecific cytotoxicity and direct, specific functional

- supression. *Diabetes* 1993;42:56-65.
185. Lipsett M, Finegood DT: β -cell neogenesis during prolonged hyperglycemia in rats. *Diabetes* 2002;51:1834-1841.
 186. Liu CC, Young LHY, Young JD: Lymphocyte-mediated cytolysis and disease. *The New England of Medicine* 1996;335:1651-1659.
 187. Liu D, Pavlovic D, Chen M-C, Flodström M, Sandler S, Eizirik DL: Cytokines induce apoptosis in β -cells isolated from mice lacking the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS^{-/-}). *Diabetes* 2000;49:1116-1122.
 188. Liu D, Darville M, Eizirik DL: Double-stranded RNA induces β -cell Fas mRNA expression and increases cytokine-induced β -cell apoptosis. *Endocrinology* 2001;142:2593-2599.
 189. Liu K, Paterson AJ, Chin E, Kudlow JE: Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic β cells: Linkage of O-linked GlcNAc to β -cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2000;97:2820-2825.
 190. Liu Y, Guth PH, Kaneko K, Livingston EH, Brunicardi FC: Dynamic in vivo observation of rat islet microcirculation. *Pancreas* 1993;8:15-21.
 191. Lowenstein CJ, Glatt CS, Bredt DS, Snyder SH: Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1992;89:6711-6715.
 192. Loweth AC, Williams GT, Scarpello JHB, Morgan NG: Evidence for the involvement of cGMP and protein kinase G in nitric oxide-induced apoptosis in the pancreatic β -cell line, HIT-T15. *FEBS letters* 1997;400:285-288.
 193. Loweth AC, Williams GT, James RF, Scarpello JH, Morgan NG: Human islets of Langerhans express Fas ligand and undergo apoptosis in response to interleukin-1 β and Fas ligation. *Diabetes* 1998;47:727-732.
 194. Lu M, Seufert J, Habener JF: Pancreatic β -cell-specific repression of insulin gene transcription by CCAAT/Enhancer-binding protein β . Inhibitory interactions with basic helix-loop-helix transcription factor E47. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:28349-28359.
 195. Lukic ML, Stosic-Grujicic S, Ostojic N, Chan WL, Liew FY: Inhibition of nitric oxide generation affects the induction of diabetes by streptozotocin in mice. *Biochemical Biophysics Research Communications* 1991;178:913-920.
 196. Lyons RC, Orloff GJ, Cunningham JM: Molecular cloning and functional

- expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *Journal of Biological Chemistry* 1992;267:6370-6374.
197. MacFarlane W, Read M, Gilligan M, Bujalska I, Docherty K: Glucose modulates the binding activity of the beta-cell transcription factor IUF1 in a phosphorylation-dependent manner. *Biochemical Journal* 1994;303:625-631.
198. MacFarlane WM, Smith SB, James RF et al.: The p38/reactivating kinase mitogen-activated protein kinase cascade mediates the activation of the transcription factor insulin upstream factor 1 and insulin gene transcription by high glucose in pancreatic beta-cells. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:20936-20944.
199. MacFarlane WM, McKinnon CM, Felton-Edkins ZA, Cragg H, James RF, Docherty K: Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells. *Journal of Biological Chemistry* 1999;274:1011-1016.
200. MacMicking J, Xie QW, Nathan C: Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology* 1997;15:323-350.
201. Maedler K, Spinas GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A, et al.: Glucose induces β -cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes* 2001;50:1683-1690.
202. Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, et al.: Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *The Journal of Clinical Investigation* 2002;110:851-860.
203. Majno G, Joris I: Apoptosis, oncosis and necrosis: an overview on cell death. *American Journal of Pathology* 1995;146:3-15.
204. Malaisse W, Malaisse-Lagae F, Sener A, Pipeleers D: Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1982;79:927-930.
205. Mandrup-Poulsen T: The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 1996;39:1005-1029.
206. Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Høiris Nielsen J, Bendixen G, Nerup J: Cytokines cause functional and structural damage to isolated islets of Langerhans. *Allergy* 1985;40:424-429.
207. Mandrup-Poulsen T, Bendtzen K, Nerup J, Dinarello CA, Svenson M, Nielsen JH: Affinity-purified human interleukin 1 is cytotoxic to islet cells of Langerhans. *Diabetologia* 1986;29:63-67.

208. Mandrup-Poulsen T, Egeberg J, Nerup J, Bendtzen K, Nielsen JH, Dinarello CA: Ultrastructural study of time-course and cellular specificity of interleukin-1 mediated islet cytotoxicity. *Acta Pathology Microbiology Immunology Scandinavian* 1987;95:55-63.
209. Marino-Buslje C, Martin-Martinez M, Mizuguchi K, Siddle K, Blundell TL: The insulin receptor: from protein sequence to structure. *Biochemical Society Transactions* 1999;27:715-726.
210. Marshak S, Totary H, Cerasi E, Melloul D: Purification of the beta-cell glucose-sensitive factor that transactivates the insulin gene differentially in normal and transformed islet cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1996;93:15057-15062.
211. Mathis D, Vence L, Benoist C: β -cell death during progression to diabetes. *Nature* 2001;414:792-798.
212. Matsuoka TA, Kajimoto Y, Watada H, Kaneto H, Kishimoto M, Umayahara Y, et al.: Glycation-dependent, reactive oxygen species mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells. *Journal of Clinical Investigation* 1997;99:144-150.
213. Mauricio D, Mandrup-Poulsen T: Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death. *Diabetes* 1998;47:1537-1543.
214. McDaniel ML, Hughes JH, Wolf BA, Easom RA, Turk J: Descriptive and mechanistic considerations of interleukin 1 and insulin secretion. *Diabetes* 1988;37:1311-1315.
215. McGarry JD, Dobbins RL: Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia* 1999;42:128-138.
216. Meglasson MD, Matschinsky FM: Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes Metabolism Review* 1986;2:163-214.
217. Mehigan DG, Bell WR, Zuidema GD, Eggleston JC, Cameron JL: Disseminated intravascular coagulation and portal hypertension following pancreatic islet autotransplantation. *Annals of Surgery* 1980;191:287-293.
218. Mellgren A, Schnell Landstrom AH, Petersson B, Andersson A: The renal subcapsular site offers better growth conditions for transplanted mouse pancreatic islet cells than the liver or spleen. *Diabetologia* 1986;29:670-672.
219. Melloul D, Ben-Neriach Y, Cerasi E: Glucose modulates the binding of an islet-specific factor to a conserved sequence within the rat I and the human insulin

- promoters. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 1993;90:3865-3869.
220. Melloul D, Marshak S, Cerasi E: Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 2002;45:309-326.
221. Menger MD, Sabine J, Walter P, Feifel G, Hammersen F, Messmer K: Angiogenesis and hemodynamics of microvasculature of transplanted islets of Langerhans. *Diabetes* 1989;38(S1):199-201.
222. Menger MD, Yamauchi J-I, Vollmar B: Revascularization and microcirculation of freely grafted islets of Langerhans. *World Journal of Surgery* 2001;25:509-515.
223. Merino JF, 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* 1997;40:1004-1010.
224. Messmer UK, Ankarcróna M, Nicotera P, Brüne B: p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. *FEBS letters* 1994;355:23-26.
225. Meyer HH, Vetterlein F, Schmidt G, Hasselblatt A: Measurement of blood flow in pancreatic islets: effect of isoproterenol and norepinephrine. *American Journal of Physiology* 1982;E298-E304.
226. Miyaura C, Chen L, Appel M, Alam T, Inman L, Hughes SD, et al.: Expression of reg/PSP, a pancreatic exocrine gene: relationship to changes in islet β -cell mass. *Molecular Endocrinology* 1991;5:226-234.
227. Moller DE: Transgenic approaches to the pathogenesis of NIDDM. *Diabetes* 1994;43:1394-1401.
228. Montanya E, Nacher V, Biarnés M, Soler J: Linear correlation between β -cell mass and body weight throughout life in Lewis rats: role of β -cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* 2000;49:1341-1346.
229. Montanya E, Bonner-Weir S, Weir GC: Transplanted beta cell response to increased metabolic demand. *Journal of Clinical Investigation* 1994;93:1577-1582.
230. Montanya E, Bonner-Weir S, Weir GC: Beta cell mass and growth after syngeneic islet cell transplantation in normal and streptozocin diabetic C57BL/6 mice. *Journal of Clinical Investigation* 1993;91:780-787.
231. Montanya E: El trasplante de islotes de páncreas como terapia en la diabetes tipo 1. *Endocrinología y Nutrición* 2001;48:1-2.

- 231a. Mori C, Nakamura N, Okamoto Y, et al.: Cytochemical identification of programmed cell death in the fusing fetal mouse palette by specific labelling of DNA fragments. *Anatomy and Embriology* 1994;190:21-28.
232. Moriwaki M, Itoh N, Miyagawa J, Yamamoto K, Imagawa A, Yamagata K, et al.: Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999;42:1332-1340.
233. Morris GE, Korner A: The effect of glucose on insulin biosynthesis by isolated islets of Langerhans of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta* 1970;208:404-413.
234. Mosmann TR, Coffman RL: TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology* 1989;7:145-173.
235. Murakami T, Fujita T, Miyake T, Ohsuka A, Taguchi T, Kikuta A: The insulo-acinar portal and insulo-venous drainage systems in the pancreas of the mouse, dog, monkey and certain other animals: a scanning electron microscopic study of corrosion casts. *Archives of Histology and Cytology* 1993;56:127-147.
236. Nacher V, Merino JF, Raurell M, Soler J, Montanya E: Normoglycemia restores β -cell replicative response to glucose in transplanted islets exposed to chronic hyperglycemia. *Diabetes* 1998;47:192-196.
237. Nagata M, Mullen Y, Matsuo S, Herrera M, Clare Salzer M: Destruction of islet isograft by severe non-specific inflammation. *Transplantation Proceedings* 1990;22:855-856.
238. Navarro X, Sutherland DE, Kennedy WR: Long-term effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy. *Annual of Neurology* 1997;42:727-736.
239. Nerup J, Mandrup-Poulsen T, Helqvist S, Andersen HU, Pociot F, Reimers JI, et al.: On the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 1994;37:S82-S89.
240. Nicholson DW, Thornberry NA: Caspases: killer proteases. *Trends in Biochemical Sciences* 1997;22:299-306.
241. Nielsen DA, Welsh M, Casadaban MJ, Steiner DF: Control of insulin gene expression in pancreatic B-cells and in an insulin producing cell line, RIN-5F cells. Effects of glucose and cAMP on the transcription of insulin mRNA. *Journal of Biochemical Chemistry* 1993;260:13586-13589.
242. Odagiri H, Wang J, German MS: Function of the human insulin promoter in primary cultured islet cells. *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:1909-1915.

243. Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein R, Magnuson MA, et al.: PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 1996;122:983-995.
244. Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T: IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO Journal* 1993;12:4251-4259.
245. Olson LK, Redmon JB, Towle HC, Robertson RP: Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein. *Journal of Clinical Investigation* 1993;92:514-519.
246. Olson LK, Sharma A, Peshavaria M, Wright CVE, Towle HC, Robertson RP, et al.: Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1995;92:9127-9131.
247. Ookawara T, Kawamura N, Kitagawa Y, Taniguchi N: Site-specific and random fragmentation of Cu,Zn-superoxide dismutase by glycation reaction. Implication of reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry* 1992;267:18505-18510.
248. Orci L: Macro- and micro-domains in the endocrine pancreas. *Diabetes* 1982;31:538-566.
249. Owerbach D, Bell GI, Rutter WJ, Shows TB: The insulin gene located on chromosome 11 in humans. *Nature* 1980;286:82-84.
250. Ozasa T, Newton MR, Dallman MJ, Shimizu S, Gray DW, Morris PJ: Cytokine gene expression in pancreatic islet grafts in the rat. *Transplantation* 1997;64:1152-1159.
251. Palmer JP, Helqvist S, Spinas GA, Mølviig J, Mandrup-Poulsen T, Andersen HU, et al.: Interactions of β -cell activity and IL-1 concentration and exposure time in isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes* 1989;38:1211-1216.

251a. Paraskevas S, Aikin R, Maysinger D, Lakey JR, Cavanagh TJ, Agapitos D, et al.: Modulation of JNK and p38 stress activated protein kinases in isolated islets of Langerhans: insulin as an autocrine survival signal. *Annals of Surgery* 2001;233:124-133.
252. Parr EL, Bowen KM, Lafferty KJ: Cellular changes in cultures of mouse thyroid glands and islets of Langerhans. *Transplantation* 1980;30:135-141.
253. Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL: Adaptation of islets to pregnancy: increased

- islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* 1992;130:1459-1466.
254. Parsons JA, Bartke A, Sorenson RL: Number and size of islets of Langerhans in pregnant human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: effect of lactogenic hormones. *Endocrinology* 1995;136:2013-2021.
255. Patty I: Homology of human pancreatic stone protein with animal lectins. *Biochemical Journal* 1988;253:309-311.
256. Pavlovic D, Chen MC, Bouwens L, Eizirik DL, Pipeleers D: Contribution of ductal cells to cytokine responses by human pancreatic islets. *Diabetes* 1999;48:29-33.
257. Pavlovic D, Chen M-C, Gysemans CA, Mathieu C, Eizirik DL: The role of interferon regulatory factor-1 in cytokine-induced mRNA expression and cell death in murine pancreatic β -cells. *European Cytokine Network* 1999;10:403-411.
258. Permutt MA: Effect of glucose on initiation and elongation rates in isolated rat pancreatic islets. *Journal of Biological Chemistry* 1974;249:2738-2742.
259. Petersen HV, Peshavaria M, Pedersen AA, Philippe J, Stein R, Madsen OD, et al.: Glucose stimulates the activation domain potential of the PDX-1 homeodomain transcription factor. *FEBS Letters* 1998;431:362-366.
260. Petrik J, Arany E, McDonald TJ, Hill DJ: 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* 1998;139:2994-3004.
261. Petrik J, Pell JM, Arany E, McDonald TJ, Dean WL, Reik W, et al.: Overexpression of insulin-like growth factor-II in transgenic mice is associated with pancreatic islet cell hyperplasia. *Endocrinology* 1999;140:2353-2363.
262. Pick A, Levisetti M, Baldwin A, Bonner-Weir S: Failure of β -cell mass compensation for insulin resistance in dexamethasone induced diabetes in female Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *Diabetes* 1998;47:A258.
263. Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, Bonner-Weir S, et al.: Role of apoptosis in failure of beta cell mass compensation for insulin resistance and β -cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes* 1998;47:358-364.
264. Pipeleers D, Van de Winkel M: Pancreatic B cells possess defense mechanisms against cell-specific toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1986;83:5267-5271.
265. Poitout V, Olson LK, Roberston RP: Chronic exposure of β TC-6 cells to supraphysiologic concentrations of glucose decreases binding of the RIPE-3b1

- insulin gene transcription activator. *Journal of Clinical Investigation* 1996;97:1041-1046.
266. Prendergast GC: Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* 1999;18:2967-2987.
267. Prentki M, Corkey BE: Are the β -cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes* 1996;45:273-283.
268. Prentki M, Roduit R, Lameloise N, Corkey BE, Assimacopoulos-Jeannet F: Glucotoxicity, lipotoxicity and pancreatic β -cell failure: a role for malonyl-CoA, PPAR α and altered lipid partitioning. *Canadian Journal of Diabetes Care* 2001;25:36-46.
269. Prentki M, Tornheim K, Corkey BE: Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. *Diabetologia* 1997;40:S32-S41.
270. Ptak W, Klimek M, Bryniarski K, Ptak M, Majcher P: Macrophage function in alloxan diabetic mice: expression of adhesion molecules, generation of monokines and oxygen and NO radicals. *Clinical and Experimental Immunology* 1998;114:13-18.
271. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A: The proapoptotic activity of Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Molecular Cell* 1999;3:287-296.
272. Rabinovitch A: An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metabolism Review* 1998;14:129-151.
273. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Shi Y, Morgan AR, Bleackley RC: DNA fragmentation is an early event in cytokine-induced islet beta-cell destruction. *Diabetologia* 1994;37:733-738.
274. Rabinovitch A: Roles of cytokines in IDDM pathogenesis and islet β -cell destruction. *Diabetes Reviews* 1993;1:215-240.
275. Rabinovitch A, Pukel C, Baquerizo H: Interleukin-1 inhibits glucose-modulated insulin and glucagon secretion in rat islet monolayer cultures. *Endocrinology* 1988;122:2393-2398.
276. Rafiq I, Kennedy HJ, Rutter GA: Glucose-dependent translocation of insulin promoter factor-1 (IPF-1) between the nuclear periphery and the nucleoplasm of single MIN6 beta-cells. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:23241-23247.

277. Rahier J, Goebbels RM, Henquin JC: Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia* 1983;24:366-371.
278. Rane SG, Dubus P, Mettus RV, Galbreath EJ, Boden G, Reddy EP, et al.: Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nature Genetics* 1999;22:44-52.
279. Raurell M, Merino JF, Nacher V, Biarnes M, Soler J, Montanya E. Preserved beta cell function with insulin treatment in islet transplantation: effect on insulin gene expression. *Transplantation Proceedings* 31:2561, 1999.
280. Reddy SA, Huang JH, Liao WS: Phosphatidylinositol 3-kinase in interleukin 1 signaling. Physical interaction with the interleukin 1 receptor and requirement in NF κ B and AP-1 activation. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:29167-29173.
281. Reddy S, Young M, Ginn S: Immunoexpression of interleukin-1 β in pancreatic islets of NOD mice during cyclophosphamide-accelerated diabetes: co-localization in macrophages and endocrine cells and its attenuation with oral nicotinamide. *The Histochemical Journal* 2001;33:317-327.
282. Reed JC: Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997;387:773-776.
283. Rhodes CJ: Introduction: the molecular cell biology of insulin production. *Cell and Developmental Biology* 2000;11:223-225.
284. Rhodes CJ, Alarcón C: What β -cell defect could lead to hyperproinsulinemia in NIDDM: some clues from recent advances made in understanding the proinsulin conversion mechanism. *Diabetes* 1994;43:511-517.
285. Rich T, Allen RL, Wyllie AH: Defying death after damage. *Nature* 2000;407:777-783.
286. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW: Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 1988;37:413-420.
287. Ricordi C, Tzakis AG, Carroll PB, Zeng YJ, Rilo HL, Alejandro R: Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. *Transplantation* 1992;53:407-414.
288. Ricordi C, Alejandro R, Rilo HH, Carroll PB, Tzakis AG, Starzi TE: Long-term in vivo function of human mantled islets obtained by incomplete pancreatic dissociation and purification. *Transplantation Proceedings* 1995;27:3382.
289. Ritz-Laser B, Meda P, Constant I, Klages N, Charollais A, Morales A, et al.:

- Glucose-induced preproinsulin gene expression is inhibited by the free-fatty acid palmitate. *Endocrinology* 1999;140:4005-4014.
290. Roche E, Assimacopoulos-Jeannet F, Witters LA, Perruchoud B, Yaney G, Corkey B, et al.: Induction by glucose of genes coding for glycolytic enzymes in a pancreatic β -cell line (INS-1). *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:3091-3098.
291. Roep BO, Stobbe I, Duinkerken G, Van Rood JJ, Lernmark A, Keymeulen B: Auto- and alloimmune reactivity to human islet allografts transplanted into type 1 diabetic patients. *Diabetes* 1999;48:484-490.
292. Roos MD, Xie W, Su K, Clark JA, Yang X, Chin E, et al.: Streptozotocin, an analog of N-cetylglucosamine, blocks the removal of O-GlcNAc from intracellular proteins. *Proceeding of the Association of American Physicians* 1998;110:422-432.
293. Roos MD, Su K, Baker JR, Kudlow JE: O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Molecular and Cellular Biology* 1997;17:6472-80.
294. Rorsman P: The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* 1997;40:487-495.
295. Rosen CB, Frohnert PP, Velosa JY, Engen DE, Sterioff S: Morbidity of pancreas transplantation during cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1991;51:123-127.
296. Ryan EA, Lakey JRT, Paty BW, Imes S, Korbitt GS, Kneteman NM, et al.: Successful islet transplantation. Continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes* 2002;51:2148-2157.
297. Sander M, Griffen SC, Huang J, German MS: A novel glucose-responsive element in the human insulin gene functions uniquely in primary cultured islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1998;95:11572-11577.
298. Sandler M, Andersson A, Hellerström C: Inhibitory effects of interleukin 1 on insulin secretion, insulin biosynthesis and oxidative metabolism of isolated rat pancreatic islets. *Endocrinology* 1987;121:1424-1431.
299. Sandler S, Bendtzen K, Eizirik DL, Strandell E, Welsh M, Welsh N: Metabolism and β -cell function of rat pancreatic islets exposed to human interleukin-1 β in the presence of a high glucose concentration. *Immunology Letters* 1990;26:245-252.
300. Sandler S, Bendtzen K, Eizirik DL, Sjöholm A, Welsh N: Decreased cell replication and polyamine content in insulin-producing cells after exposure to human

- interleukin-1 beta. *Immunology Letters* 1989;22:267-272.
301. Sakahira H, Enari M, Nagata S: Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998;391:96-99.
 302. Scaglia L, Smith FE, Bonner-Weir S: Apoptosis contributes to the involution of β cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology* 1995;136:5461-5468.
 303. Scaglia L, Cahill CJ, Finegood DT, Bonner-Weir S: Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology* 1997;138:1736-1741.
 304. Scarim AL, Heitmeier MR, Corbett JA: Irreversible inhibition of metabolic function and islet destruction after a 36-hour exposure to interleukin-1 β . *Endocrinology* 1997;138:5301-5307.
 305. Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, McCullough CS, Weide LG, Boyle PJ: Results of our first nine intraportal islet allografts in type 1, insulin-dependent diabetic patients. *Transplantation* 1991;51:76-85.
 306. Schulak JY, Mayes JT, Hricik DE: Combined kidney and pancreas transplantation. *Archives of Surgery* 1990;125:881-884.
 307. Segall L, Lameloise N, Assimacopoulos-Jeannet F, Roche E, Corkey P, Thumelin S, et al.: Lipid rather glucose metabolism is implicated in altered insulin secretion caused by oleate in INS-1 cells. *American Journal of Physiology* 1999;277:E521-E528.
 308. Shapiro AMJ, Lakey JRT, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, et al.: Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *The New England Journal of Medicine* 2000;343:230-238.
 309. Sharma A, Zangen DH, Reitz P, Taneja M, Lissauer ME, Miller CP, Weir GC, Habener JF, Bonner-Weir S: The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. *Diabetes* 1999;48:507-513.
 310. Sharma A, Stein R: Glucose-induced transcription of the insulin gene is mediated by factors required for beta-cell-type-specific expression. *Molecular and Cellular Biology* 1994;14:871-879.
 311. Sharp DW, Swanson CJ, Olack BJ: Protection of encapsulated human islets implanted without immunosuppression in patients with type I or type II diabetes and in nondiabetic control subjects. *Diabetes* 1994;43:1167-1170.

312. Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J: Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1992;89:4495-4499.
313. Shimabukuro M, Zhou Y, Levi M, Unger R: Fatty acid-induced β cell apoptosis: A link between obesity and diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1998;95:2498-2502.
314. Sibley RK, Sutherland DE, Goetz F, Michael AF: Recurrent diabetes mellitus in the pancreas iso- and allograft. A light and electron microscopic and immunohistochemical analysis of four cases. *Laboratory investigation* 1985;53:132-144.
315. Sjöholm A: 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* 1991;289:249-252.
316. Soares MB, Schon E, Henderson A: RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon. *Molecular Cell Biology* 1985;5:2090-2103.
317. Southern C, Schulster D, Green IC: Inhibition of insulin secretion by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α via an L-arginine-dependent nitric oxide generation mechanism. *FEBS letters* 1990;276:42-44.
318. Southgate J, Francis PJ, Wilkin TJ, Bone AJ: Islet cell defence and repair mechanisms in type 1 diabetes: role for the reg gene? *Diabetologia* 1991;380:A96.
319. Sparrow LG, McKern NM, Gorman JJ, Strike PM, Robinson CP, Bentley JD, et al.: The disulfide bonds in the c-terminal domains of the human insulin receptor ectodomain. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:29460-29467.
320. Spinas GA, Laffranchi R, Francoys I, David I, Richter C, Reinecke M: The early phase of glucose-stimulated insulin secretion requires nitric oxide. *Diabetologia* 1998;41:292-299.
321. Spinas GA: The dual role of nitric oxide in islet β -cells. *News in Physiological Sciences* 1999;14:49-54.
322. Stassi G, De-Maria R, Trucco G, Rudert W, Testi R, Galluzzo A, et al.: Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Experimental Medicine* 1997;186:1193-1200.
323. Stassi G, Todaro M, Richiusa P, Giordano M, Mattina A, Sbriglia MS, et al.: Expression of apoptosis-inducing CD95 (Fas/Apo-1) on human β -cells sorted by

- flow-cytometry and cultured in vitro. *Transplantation Proceedings* 1995;27:3271-3275.
324. Stefan Y, Orci L, Malaisse-Lagae F, Perrelet A, Patel Y, Unger RH: Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes* 1982;31:694-700.
325. Stegall MD, Lafferty KJ, Kam I, Gill RG: Evidence of recurrent autoimmunity in human allogeneic islet transplantation. *Transplantation* 1996;63:1272-1274.
326. Steiner DF, Chan SJ, Welsh JM, Kwok SC: Structure and evolution of the insulin gene. *Annual Review of Genetics* 1985;19:463-484.
327. Stephanian E, Lloveras JJ, Sutherland DE, Farney AC, Field MJ, Kaufman DB, et al.: Prolongation of canine islet allograft survival by 15-deoxyspergualin. *Journal of Surgical Research* 1992;52:621-624.
328. Stevens RB, Ansite JD, Mills C, Lokeh A, Rossini JJ, Saxena M: Nitric oxide mediates islet dysfunction of rat and mouse islets after transplantation. *Transplantation* 1996;61:1740-1749.
329. Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF: Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nature Genetic* 1997;15:106-110.
330. Stoffers DA, Kieffer TJ, Hussain MA, Drucker DJ, Bonner-Weir S, Habener JF, Egan JM: Insulinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein IDX-1 and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes* 2000;49:741-748.
331. Strandell E, Buschard K, Saldeen J, Welsh N: Interleukin-1 β induces the expression of HSP70, heme oxygenase and Mn-SOD in FACS-purified rat islets β -cells, but not in α -cells. *Immunology Letters* 1995;48:145-148.
332. Su K, Roos MD, Yang X, Han I, Paterson AJ, Kudlow JE: An N-terminal region of Sp1 targets its proteasome-dependent degradation in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry* 1999;74:15194-15202.
333. Suarez-Pinzon WL, Strynadka K, Schulz R, Rabinovitch A: Mechanisms of cytokine-induced destruction of rat insulinoma cells: the role of nitric oxide. *Endocrinology* 1994;134:1006-1010.
- 333a. Suschek C, Fehsel K, Kroncke KD, Sommer A, Kolb-Bachofen V: Primary cultures of rat islet capillary endothelial cells. Constitutive and cytokine-inducible macrophage like nitric oxide synthases are expressed and activities regulated by

- glucose concentration. *American Journal of Pathology* 1994;145:685-695.
334. Sutherland DE: Pancreas and islet transplantation. I. Experimental studies. *Diabetologia* 1981;20:161-185.
335. Sutherland DER, Gruessner A, Moudry-Munns KC: Tabulation of cases from the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) and analysis of United Network for Organ Sharing (UNOS) United States of America Pancreas Transplant Registry data according to multiple variables. *Transplantation Proceedings* 1993;25:1707-1709.
336. Swenne I: Effects of aging on the regenerative capacity of the pancreatic B-cell of the rat. *Diabetes* 1983;32:14-19.
337. Swenne I: The role of glucose in the in vitro regulation of cell cycle kinetics and proliferation of fetal pancreatic β -cells. *Diabetes* 1982;31:754-760.
338. Swenne I: Pancreatic β -cell growth and diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992;35:193-201.
339. Swenne I, Andersson A: Effect of genetic background on the capacity for islet cell replication in mice. *Diabetologia* 1984;27:464-467.
340. Tajiri Y, Moller C, Grill V: Long term effects of aminoguanidine on insulin release and biosynthesis: evidence that the formation of advanced glycosylation end products inhibits β -cell function. *Endocrinology* 1997;138:273-280.
341. Takasawa S, Yamamoto K, Terazono K, Okamoto H: Novel gene activated in rat insulinomas. *Diabetes* 1986;35:1178-1180.
342. Tanaka Y, Gleason CE, Tran POT, Harmon JS, Robertson RP: Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1999;96:10857-10862.
343. Taylor SI, Accili D, Imai Y: Insulin resistance or insulin deficiency. Which is the primary cause of NIDDM? *Diabetes* 1994;43:735-740.
344. Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S, Shiga K, Yonemura Y, Tochino Y, et al.: A novel gene activated in regenerating islets. *Journal of Biological Chemistry* 1988;263:2111-2114.
- 344a. Teuscher AU, Kendall DM, Smets YFC, Leone JP, Sutherland DER: Successful islet autotransplantation in humans: functional insulin secretory reserve as an estimate of surviving islet cell mass. *Diabetes* 1998;47:324-330.

345. Thomas FT, Contreras JL, Bilbao G, Ricordi C, Curiel D, Thomas JM: Anoikis, extracellular matrix and apoptosis factors in isolated cell transplantation. *Surgery* 1999;126:299-304.
346. Thornberry NA, Lazebnik Y: Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316.
347. Tisch R, McDevitt H: Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 1996;85:291-297.
348. Tobin BW, Lewis JT, Chen DZX, Finegood DT: Insulin secretory function in relation to transplanted islet mass in STZ-induced diabetic rats. *Diabetologia* 1993;42:98-105.
349. Tyden G, Reinholt FP, Sundkvist G, Bolinder J: Recurrence of autoimmune diabetes mellitus in recipients of cadaveric pancreatic grafts. *The New England Journal of Medicine* 1996;335:860-863.
350. Ueki M, Yasunami Y, Motoyama K, Funakoshi A, Ikeda S, Tanaka M: The amelioration of hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats after the intraportal transplantation of an insufficient number of islets by nicotinamide treatment. *Transplantation* 1995;60:313-317.
351. Vargas F, Somoza N, Sanmarti A, Pujol-Borrell R: Endotoxin contaminating islet preparations may explain primary non-function of human islet grafts. *Autoimmunity* 1995;21:83-84.

351a. Vargas F, Vives-Pi M, Somoza N, Armengol P, Alcalde L, Martí M, et al.: Endotoxin contamination may be responsible for the unexplained failure of human pancreatic islet transplantation. *Transplantation* 1998;65:722-727.
352. Vasir B, Jonas J, Steil G, Hollister-Lock J, Hasenkamp W, Sharma A, et al.: Gene expression of VEGF and its receptors Flk-1/KDR and Flt-1 in cultured and transplanted rat islets. *Transplantation* 2001;71:924-935.
353. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunology Methods* 1995;184:39-51.
354. Wahoff DC, Papalois BE, Najarian JS, Kendall DM, Farney AC, Leone JP: Autologous islet transplantation to prevent diabetes after pancreatic resection. *Annual of Surgery* 1995;222:562-579.
355. Wang J, Leonardo M: Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *Journal of Cell Science*

- 2000;113:753-757.
356. Warnock GL, Kneteman NM, Ryan EA, Ravinovich A, Rajotte RV: Long-term follow-up after transplantation of insulin-producing pancreatic islets into patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1992;35:89-95.
357. Warnock GL, Rajotte RV: Critical mass of purified islets that induce normoglycemia after implantation into dogs. *Diabetes* 1988;37:467-470.
358. Warnock GL, Dabbs KD, Evans MG, Gattral MS, Kneteman NM, Rajotte RV: Critical mass of islets that function after implantation in a large mammalian. *Hormone Metabolism Research* 1990;S25:156-161.
359. Watkins LR, Hansen MK, Nguyen KT, Lee JE, Maier SF: Dynamic regulation of the proinflammatory cytokine, interleukin-1 β : molecular biology for non-molecular biologists. *Life Sciences* 1999;65:449-481.
360. Weber T, Zemelman BV, McNew JA, Westermann B, Gmachl M, Parlati F, Sollner TH, Rothman JE: SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 1998;92:759-772.
- 360a. Weibel ER: Point counting methods. In: *Stereological Methods*. Academic Press Ltd., Londres, vol 1, pp 101-161.
361. Weir GC, Bonner-Weir S, Leahy JL: Islet mass and function in diabetes and transplantation. *Diabetes* 1990;90:401-405.
362. Welsh M, Scherberg N, Gilmore R, Steiner DF: Translational control of insulin biosynthesis. Evidence for regulation of elongation, initiation and signal-recognition-particle-mediated translational arrest by glucose. *Biochemical Journal* 1986;235:459-467.
363. Welsh N, Eizirik DL, Bendtzen K, Sandler S: Interleukin-1 β -induced nitric oxide production in isolated rat pancreatic islets requires gene transcription and may lead to inhibition of the Krebs cycle enzyme aconitase. *Endocrinology* 1991;129:3167-3173.
364. Welsh N: Interleukin-1 β -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. *Journal of Biological Chemistry* 1992;271:8307-8312.
365. Welsh N, Sandler S: Interleukin-1 β induces nitric oxide production and inhibits the activity of aconitase without decreasing glucose oxidation rates in isolated mouse pancreatic islets. *Biochemical and Biophysical Research Communications*

- 1992;182:333-340.
366. Wertz IE, Hanley MR: Diverse molecular provocation of programmed cell death. *Trends in Biochemical Sciences* 1996;21:359-364.
367. Wessels NK, Cohen JH: Early pancreas organogenesis: morphogenesis, tissue interactions and mass effects. *Developmental Biology* 1967;15:237-270.
368. Westermark P, Wilander E: The influence of amyloid deposits on the islet volume in maturity onset diabetes mellitus. *Diabetologia* 1978;15:417-421.
369. Whicher JT, Evans SW: Cytokines in disease. *Clinical Chemistry* 1990;36:1269-1281.
370. White MW, Kahn CR: The insulin signalling system. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:1-4.
371. White SA, Nicholson ML, Hering BJ: Can islet cell transplantation treat diabetes? *British Medical Journal* 2000;321:651-652.
372. Wollheim CB, Lang J, Regazzi R: The exocytotic process of insulin secretion and its regulation by Ca^{2+} and G proteins. *Diabetes Reviews* 1996;4:276-297.
373. Wolter KG, Hsu Y-T, Smith CL, Nechushtan A, Xi X-G, Youle RJ: Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *Journal of Cell Biology* 1997;139:1281-1292.
374. Xanthoudakis S, Nicholson DW: Heat shock proteins as death determinants. *Nature Cell Biology* 2000;2:E163-E165.
375. Xie K, Huang S, Zhongyun D, Fidler IJ: Cytokine-induced apoptosis in transformed murine fibroblasts involves synthesis of endogenous nitric oxide. *International Journal of Oncology* 1993;3:1043-1048.
376. Xie Q-W, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, et al.: Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992;256:225-228.
377. Xie Q, Nathan C: The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *Journal of Leukocyte Biology* 1994;56:576-582.
378. Xu G, Stoffers D, Habener JF, Bonner-Weir S: Increased β cell mass as mechanism of ameliorated glucose tolerance after exendin-4 treatment in diabetic pancreatectomized rats. *Diabetes* 1999;48:2270-2276.

379. Yamada K, Takane-Gyotoku N, Yuan X, Ichikawa F, Inada C, Nonaka K: Mouse islet cell lysis mediated by interleukin-1-induced Fas. *Diabetologia* 1996;39:1306-1312.
380. Yamada K, Takane N, Otabe S, Inada C, Inoue M, Nonaka K: Pancreatic beta-cell-selective production of tumor necrosis factor-alpha induced by interleukin-1. *Diabetes* 1993;42:1026-1031.
381. Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, et al.: Bid-deficient mice are resistant to fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 1999;400:886-891.
382. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M: Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991;352:345-347.
383. Yoshida K, Hirokawa J, Tagami S, Kawakami Y, Urata Y, Kondo T: Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia* 199 ;38:201-210.
384. Zhang W, Smith C, Howlett C, Stanimirovic D: Inflammatory activation of human brain endothelial cells by hypoxic astrocytes in vitro is mediated by IL-1beta. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2000;20:967-978.
385. Zhao L, Cissell MA, Henderson E, Colbran R, Stein R: The RIPE3b1 activator of the insulin gene is composed of a protein(s) of approximately 43 kDa, whose DNA binding activity is inhibited by protein phosphatase treatment. *The Journal of Biological Chemistry* 2000;275:10532-10537.
386. Zumsteg U, Frigerio S, Hollander GA: Nitric oxide production and Fas surface expression mediate two independent pathways of cytokine-induced murine β -cell damage. *Diabetes* 2000;49:39-47.