

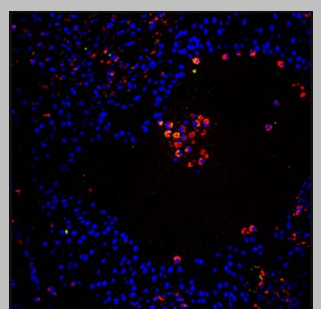
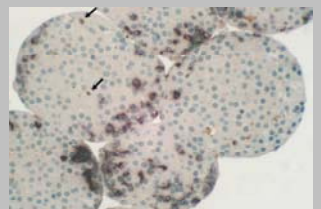
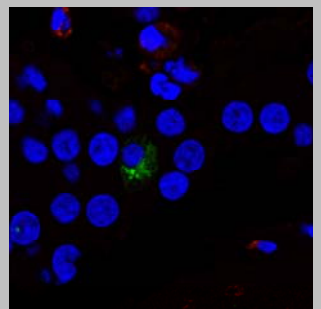
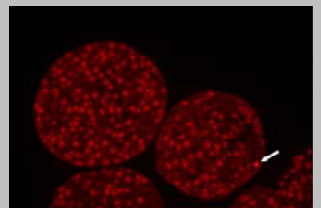
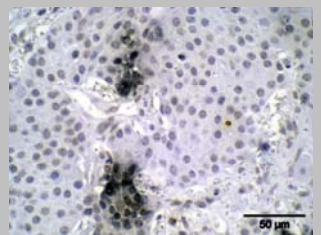
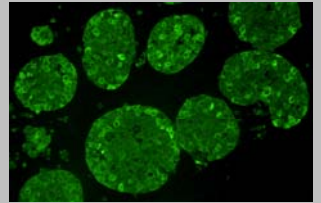
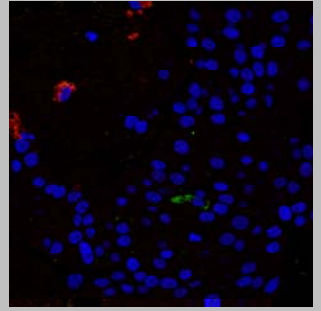
UNIVERSITAT DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES CLÍNiques

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

Marta Montolio Rusiñol

2006



UNIVERSITAT DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES CLÍNiques

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

Marta Montolio Rusiñol

2006

Departament Ciències Clíiques
Facultat Medicina
Universitat de Barcelona

Programa de Doctorat: Biomedicina
Bienni 2000-2002

Memòria presentada per la llicenciada **Marta Montolio Rusiñol** per optar al grau de Doctor en Biologia.

Aquesta tesi doctoral ha estat realitzada sota la direcció del Dr. Eduard Montanya i Mias en el Servei d'Endocrinologia de IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge i el Laboratori de Diabetis i Endocrinologia Experimental del Departament de Ciències Clíiques de la Universitat de Barcelona al Campus de Bellvitge.

Marta Montolio Rusiñol

Eduard Montanya i Mias
Desembre, 2006

AGRAÏMENTS

Puf! No sé què dir....

Que ja està!, qui ho hauria de dir, oi? Doncs, sí família, aquí estem.

Voldria agrair-vos el vostre ajut a tots els que heu estat amb mi al llarg d'aquests anys. Als que em van donar l'impuls per començar i als que m'heu donat l'impuls per acabar, als que heu estat aquí des del principi i als que us heu incorporat més tard, o als que heu marxat... A tots. No faré una enumeració de tots els noms, no em ve gens de gust fer una llista, però creieu-me, tots hi esteu.

A qui sí remarcaré, però, és a tota la gent que ha pres part activa en l'elaboració de la tesi. Primer de tot voldria agrair al Dr. Joan Soler la oportunitat que em va donar de pertànyer al grup de Diabetis i Endocrinologia Experimental, sense això ja no hauria ni començat. També li voldria agrair al Dr. Eduard Muntanya tot el que he après durant aquests anys sota la seva direcció, que ha sigut molt, moltíssim. Han sigut uns quants anys, eh jefe?

I sobretot, sobretot, vull agrair tot a les meves companyes (no és un error tipogràfic... és que tot som noies!) del laboratori.

Començaré però per els originaris del grup, els que van estar aquí quan tot va començar: el Víctor i la Mercè, gràcies per la vostra ajuda a la novinguda. A la Montse, ella va ser la meva mestra i els seus resultats han estat la base d'aquest estudi. A més a més de mestra, també ha estat una bona amiga i crec que ens ho hem passat molt bé. A l'Olga, la tècnica que hi havia en aquells moments i que se'n va fer un tip de fixar i fixar empelts minúsculs de la Marta, "la manga", com ella em deia.

També vull agrair molt, moltíssim, a la Noe. A més de tot el que m'ha ajudat en la interpretació dels resultats, en com continuar, en com fer-ho ara... també per tot el que m'ha ajudat a nivell personal que... no ha estat poc! Moltíssimes gràcies Noe, ets una gran amiga.

I la Jessi. Ai, mi Jess! Què et puc dir? Que "muchísimas gràcias por todo mi niña".

I als nous fitxatges. Ja no tan nous. I és que... com passa el temps!. L'Eli, apa que no em rigut, no?, mi brava Eli. I és que això de compartir la dark side de la "poiata"... uneix molt. A la Sílvia, que això de fer servir la mateixa tècnica també uneix molt, no?, jejeje. I a les UTIP, la Gema i la Montse, que sense els seus despistes, i que si pàncrees por aquí, color de les parets por allà...

no hauríem rigut tant. I a la Géraldine, que tot i que el poquet temps que em compartit crec que també hem rigut bastant. No, si això ha estat un cau de risas.....

En fin, que ha estat molt, però que molt divertit, compartir tot aquest temps amb vosaltres, i que si hi hagut una cosa de molt bona és lo bé que ens ho hem passat i rigut sempre totes plegades.

A més, també voldria agrair a tota la gent de la quarta planta que en algun moment m'ha donat un cop de mà, que han sigut bastants. Des de la gent de bioquímica, als d'anatomia, als de infeccioses, al Benja (ai corasón! de tècnic i psicoterapeuta pel preu de dues hores de confocal a fantàstic company en els SCTs!!! no hauria sabut què fer sense tu!) i a l'Ester dels SCT... A tots, gràcies.

Ostres i això ja comença a semblar un anunci de coca-cola: a los que me ayudaron y a los que no... A los que me dijeron que lo hiciera y a los que no... A los que me dijeron que lo dejara y a los que no... A los que... y a los que no... A todos ellos, gracias por estar ahí.

I ja. No us sentiu decepcionats la gent que m'envolta en la meva vida personal (sabeu que heu estat molt importants per mi, i no només durant aquests anys, molts ja ho éreu d'abans) perquè no hagi fet un llistat amb els vostres noms. No em sembla just, perquè us hauria de posar en algun ordre i crec que no us ho mereixeu. A més, no em sortirien uns llistats tan maravillosos com els de la Shei Shonagon, així que... ni hablar! Ho deixo per al meu llibre de capçalera personal.

Un petó a tots.

ÍNDEX

ABREVIATURES	13
RESUM DE L'ESTUDI	17
INTRODUCCIÓ	
1. Diabetis mellitus	23
1.1. Diabetis mellitus tipus 1	24
1.2. Diabetis mellitus tipus 2	27
2. Massa cel·lular beta	28
2.1. Renovació i augment de les cèl·lules beta	28
2.2. Mort de les cèl·lules beta	30
3. Mort cel·lular	31
3.1. Necrosi	31
3.2. Apoptosi	32
3.2.1. Caspases	33
3.2.2. Vies apoptòtiques	35
3.2.3. Reguladors de l'apoptosi	37
3.2.4. Inhibidors de l'apoptosi	37
3.3. Mort cel·lular beta	39
3.3.1. Necrosi i cèl·lula beta	39
3.3.2. Apoptosi i cèl·lula beta	40
4. Glucosa i cèl·lula beta	43
5. Citocines	45
5.1. Classificació de les citocines	45
5.2. Citocines i diabetis mellitus	46
5.2.1. Citocines i diabetis mellitus de tipus 1	46
5.2.2. Citocines i diabetis mellitus de tipus 2	47
5.3. Efectes de les citocines sobre la cèl·lula beta	48
6. Trasplantament d'illots pancreàtics	51
6.1. Trasplantament de pàncrees	51
6.2. Trasplantament d'illots pancreàtics	52
6.2.1. Història del trasplantament d'illots	53
6.2.2. Massa cel·lular beta i trasplantament d'illots	55
6.2.3. Pèrdua de teixit beta en el trasplantament d'illots	58
6.2.3.1. Pèrdua de teixit beta durant l'obtenció dels illots	58
6.2.3.2. Pèrdua de teixit beta després del trasplantament	59

HIPÒTESI I OBJECTIUS	65
-----------------------------------	----

MATERIAL I MÈTODES

7. Disseny experimental	69
8. Animals experimentació	70
9. Inducció de la diabetis	71
10. Mesura del pes i la glucèmia dels animals.....	72
11. Aïllament dels illots pancreàtics	72
12. Cultiu d'illots	73
13. Incubació dels illots amb l'inhibidor de les caspases (z-VAD.fmk)	73
14. Cultiu dels illots amb una barreja de citocines.....	73
15. Contingut d'insulina i de DNA dels illots.....	73
16. Trasplantament d'illots	74
17. Extracció dels empelts	75
18. Extracció de l'RNA total.....	75
19. Síntesi del DNA complementari	76
20. PCR quantitativa a temps real.....	76
20.1. Principis de la PCR quantitativa a temps real.....	76
20.2. Quantificació de l'expressió gènica de citocines per PCR quantitativa a temps real	79
21. Immunohistoquímica	81
21.1. Immunohistoquímica de CD68 per microscòpia òptica	81
21.2. Tinció de IL-1 β , iNOS, CD68 per microscòpia confocal	81
21.3. Quantificació de la mort cel·lular	82
21.3.1. Apoptosi.....	82
21.3.1.1. Tècnica del TUNEL	82
21.3.1.2. Iodur de propidi.....	84
21.3.2. Àrea de necrosi insular.....	85
21.4. Quantificació de la massa de les cèl·lules beta	85
22. Anàlisi estadística.....	86

RESULTATS

I. EXPRESSIÓ DE CITOCINES EN EL TRASPLANTAMENT D'ILLOTS PANCREÀTICS

23. Evolució metabòlica dels animals trasplantats.....	89
24. Quantificació de RNA total	90
25. Establiment del llindar de fluorescència i eficiències d'amplificació de les reaccions de PCR ..	91
26. Quantificació de l'expressió gènica de les citocines	92
26.1. Expressió d'IL-1 β	92

26.2. Expressió de TNF- α	93
26.3. Expressió d'IL-6	94
26.4. Expressió d'IL-10	95
27. Detecció de macròfags, IL-1 β i iNOS en l'empelt	96
27.1. Presència de macròfags en l'empelt.....	96
27.2. Presència de IL-1 β i iNOS en l'empelt.....	97
II. INHIBICIÓ DE L' APOPTOSI I TRASPLANTAMENT D'ILLOTS PANCREÀTICS	
28. Apoptosi després de l'aïllament dels illots	99
29. Inhibició de l'apoptosi en els illots <i>in vitro</i>	100
29.1. Cultiu dels illots amb citocines i z-VAD.fmk	100
29.1.1. Apoptosi dels illots tractats amb citocines i z-VAD.fmk.....	101
29.1.2. Contingut d'insulina i DNA en els illots tractats amb citocines i z-VAD.fmk.....	102
30. Inhibició de l'apoptosi en el trasplantament d'illots	103
30.1. Dosi de z-VAD.fmk necessària per reduir l'apoptosi en el trasplantament d'illots.....	103
30.2. Necrosi	104
30.3. Efecte de la inhibició de les caspases en l'evolució del trasplantament d'illots	105
30.3.1. Evolució metabòlica dels animals trasplantats.....	105
30.3.2. Evolució de la massa beta trasplantada	107
DISCUSSIÓ	111
CONCLUSIONS	125
BIBLIOGRAFIA	129
PRODUCCIÓ CIENTÍFICA	153

ABREVIATURES

AIF	Factor inductor de l'apoptosi (<i>Apoptosis Inducing Factor</i>)
ANOVA	Anàlisi de la Variança
APC	Cèl·lules presentadores d'antígens (<i>Antigen Presenting Cells</i>)
ATP	Trifosfat d'adenosina
BSA	Albúmina sèrica bovina
BCIP/NBT	5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfatasa/nitroblue tetrazolium
cDNA	Àcid desoxiribonucleic complementari
CK	Citocina
C_T	Cicle llindar de fluorescència
DAB	3,3-diaminobenzidina tetrahydroclorur
DMID	Diabetis mellitus insulino-dependent (tipus 1)
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DNasa	Desoxiribonucleasa
dNTP	Trifosfat de desoxinucleòtids
EDTA	Etilendiaminotetraacètic
EEM	Error Estàndard de la Mitjana
ELISA	Enzimoimmunoassaig sobre fase sòlida (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ERK	Proteïna cinasa regulada per senyals extracel·lulars (<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>)
FADD	Proteïna associada a Fas amb un domini de mort (<i>Fas-associated death domain protein</i>)
FasL	Lligand de Fas (<i>Fas ligand</i>)
FCS	Serum de vedella fetal (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FITC	Forma reactiva del isotiocianat (<i>Fluorescein-5-isothiocyanate</i>)
GSH	Glutatió
IDMID	Diabetis mellitus insulino-independent (tipus 2)
IAP	Proteïna inhibidora de l'apoptosi (<i>Inhibitor-of-apoptosis proteins</i>)
IEQ	Illot equivalent
IFN-γ	Interferó- γ
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-10	Interleucina-10
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Sintasa de l'òxid nítric induïble
IP	Iodur de propidi

Abreviatures

JNK	Proteïna cinasa aminoterminal c-Jun (<i>c-JUN amino-terminal kinase</i>)
LPS	Lipopolisacàrid
MAPK	Proteïna cinasa p38 activada per mitògens (<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>)
MHC	Complex major d'histocompatibilitat (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
mRNA	Àcid ribonuclèic missatger
NAD⁺	Dinucleòtid d'adenina-nicotinamida oxidat
NADH	Dinucleòtid d'adenina-nicotinamida reduït
NO	Òxid nítric
PARP	Poli (ADP-ribosa)-polimerasa
PBS	Tampó fosfat salí (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDAR	<i>Pre-Development TaqMan[®] Assay Reagents</i>
PDX-1	<i>Pancreatic-duodenum homeobox-1</i>
PLN	Nòduls limfàtics pancreàtics (<i>Pancreatic Lymph Nodes</i>)
PNF	Pèrdua de funció primària (<i>Primary non-function</i>)
PFA	Paraformaldehid
RNA	Àcid ribonuclèic
RNasa	Ribonucleasa
ROI	Espècies reactives d'oxigen (<i>Reactive Oxygen Intermediates</i>)
rRNA	Àcid ribonucleic ribosòmic
STZ	Estreptozotocina
TGF-β	Factor de creixement transformant β (<i>Transforming Growth Factor β</i>)
TNF-α	Factor de necrosi tumoral- α (<i>Tumor necrosis factor-α</i>)
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling</i>
z-VAD.fmk	z-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona

RESUM DE L'ESTUDI

La diabetis mellitus és una malaltia que està afectant a més de 170 milions de persones en tot el món i es calcula que aquest nombre s'haurà duplicat l'any 2.030. D'aquestes persones afectades, al voltant del 10% són diabètics de tipus 1. Aquest tipus de diabetis es caracteritza per la destrucció de les cèl·lules beta productores de la insulina, la qual cosa fa que els nivells de glucosa en sang augmentin. Actualment per aconseguir el control dels nivells de glucosa en sang en aquests pacients diabètics cal l'administració d'insulina exògena. Una bona teràpia curativa seria aquella que retornés al pacient la seva capacitat endògena de produir insulina de manera controlada i així normalitzar el seu control metabòlic. La millor manera d'aconseguir aquest objectiu és trasplantant les cèl·lules beta productores de la insulina que responen de manera regulada als nivells de glucosa de l'organisme.

El trasplantament d'illots pancreàtics es presenta com una teràpia molt prometedora però encara cal solventar algunes limitacions abans d'aplicar-lo com a tractament de manera estesa. Uns dels problemes és la limitada disponibilitat d'òrgans i la pèrdua de teixit que es produeix després del trasplantament, tant per la fallida de l'empelt com per el rebuig. Cal trasplantar un elevat nombre de cèl·lules beta o massa beta, per sota del qual no s'aconsegueix retornar a la normoglicèmia i actualment es requereix més d'un pàncrees per aconseguir aquesta massa crítica.

En treballs del nostre grup s'havia descrit la pèrdua de massa beta funcional que es produeix durant els primers dies després del trasplantament i que pot portar a la fallida del trasplantament. Aquesta pèrdua és deguda tant a mecanismes d'apoptosi com de necrosi i es produeix de manera prèvia als fenòmens de rebuig. Els mediadors d'aquesta mort no es coneixen bé, però ha estat suggerit que després del trasplantament es produiria una resposta inflamatòria comuna en tots els trasplantaments ja siguin singènics, al·logènics o xenogènics. Són ben coneguts els efectes citotòxics de les citocines proinflamatòries sobre la síntesi i secreció d'insulina i també sobre la viabilitat de les cèl·lules beta i, si s'expressessin en l'empelt, podrien conduir a la fallida de l'empelt.

D'altra banda, el nostre grup també ha descrit que els illots trasplantats exposats a altes concentracions de glucosa presenten una menor funcionalitat de les cèl·lules beta i un contingut d'insulina reduït en comparació amb els illots trasplantats a receptors normoglicèmics. També que l'augment de l'apoptosi que es produeix en l'empelt durant els primers dies després del trasplantament es manté augmentat en els empelts exposats a una hiperglicèmia sostinguda. La relació, però, entre la hiperglicèmia i l'expressió de les citocines inflamatòries en l'empelt no ha estat estudiada. Un millor coneixement dels factors citotòxics que estan contribuint a la pèrdua inicial de funció i massa dels illots trasplantats podria ajudar a

dissenyar estratègies que reduïssin aquesta pèrdua, fent que fos necessària una menor massa beta a trasplantar per a aconseguir un millor pronòstic de l'empelt.

L'expressió de tots aquests factors citotòxics en l'empelt acaben desencadenant la cascada d'activació de les caspases i finalment l'apoptosi. L'apoptosi és un procés altament regulat en el qual les caspases (proteases dependents de cisteïna) hi juguen un paper principal. Els inhibidors de les caspases han estat usats amb èxit en alguns models *in vitro* i *in vivo* per reduir l'apoptosi i s'han proposat com a teràpia de malalties en les quals l'apoptosi hi juga un paper principal. Com que en l'empelt d'illots durant els primers dies del trasplantament es produeix un augment de l'apoptosi de les cèl·lules beta, esperaríem que l'ús d'un inhibidor de les caspases aconseguís reduir aquesta mort inicial. La reducció de la mort inicial podria correspondre amb una millora del pronòstic de l'empelt, en una disminució de la massa que es requeriria per a aconseguir la normoglicèmia del receptor diabètic i així es podria optimitzar l'ús de la limitada quantitat de teixit de què es disposa per al trasplantament d'illots pancreàtics.

L'objectiu de l'estudi ha estat el d'aprofundir en el coneixement dels fenòmens que tenen lloc durant els primers dies després del trasplantament d'illots i que després acabaran afectant la viabilitat i funció de l'empelt i, per tant, l'èxit del trasplantament. En concret, es va estudiar l'expressió de citocines inflamatòries durant els primers dies després del trasplantament singènic i si aquesta expressió estava condicionada per la hiperglicèmia del receptor. També es va estudiar si una reducció en la mort de les cèl·lules inicialment trasplantades millorava el pronòstic del trasplantament.

En estudiar l'expressió de diferents citocines inflamatòries en l'empelt d'illots singènics durant els primers dies després del trasplantament es va poder observar que l'expressió de IL-1 β , TNF- α , IL-6 i IL-10 estava molt augmentada el primer dia després del trasplantament. L'expressió d'aquestes citocines disminuïa en els dies posteriors (3 i 7 després del trasplantament), tot i que generalment, a excepció de la IL-6, es mantenien a nivells superiors als dels illots frescos i en cultiu. La hiperglicèmia potenciava de manera significativa l'expressió del TNF- α i la IL-6 en el dia 1 després del trasplantament, suggerint que durant el primer dia després del trasplantament els illots trasplantats a receptors hiperglicèmics estaven sotmesos a una major activitat proinflamatòria. En aquest estudi també es va detectar la presència de proteïna de IL-1 β així com de la sintasa de l'òxid nítric induïble (iNOS), enzim responsable de la formació d'òxid nítric, metabòlit amb un paper important en la mort de les cèl·lules beta mediada per les citocines.

Tant la IL-1 β com l'iNOS estaven produïts principalment per els macròfags, tot i que altres tipus cel·lulars hi contribuïen de manera minoritària.

Usant un inhibidor de les caspases (z-VAD.fmk) es va aconseguir reduir la mort per apoptosi en els empelts de 3 dies després del trasplantament. En els estudis a llarg termini (30 dies després del trasplantament) es va observar una millora del pronòstic de l'empelt quan els illots s'havien tractat amb el z-VAD.fmk abans de trasplantar-los, aconseguint una millor taxa de curació dels receptors diabètics, així com un augment de la massa beta dels empelts. Així doncs, la reducció de la mort inicial per apoptosi del teixit trasplantat es va reflectir en una millora de l'evolució de l'empelt i en un major nombre de receptors curats.

Aquests resultats mostren que des del primer moment del trasplantament es produeix una important resposta inflamatòria en la zona de la implantació dels illots amb la producció de citocines que pot contribuir a la gran pèrdua de massa beta que es detecta en aquest moment. Aquesta resposta inflamatòria és independent del rebuig ja que es produeix en un model de trasplantament singènic i es troba parcialment modificada per la concentració de glucosa en sang del receptor, suggerint que d'entre els efectes negatius que té la hiperglucèmia sobre els empelts d'illots pancreàtics s'inclou el d'una major inflamació. Aquesta resposta inflamatòria també. També hem pogut comprovar que la reducció de la mort de les cèl·lules beta inicial condueix a una millora en el pronòstic del trasplantament, aconseguint la curació de la diabetis fent servir un nombre d'illots inferior al que d'altra manera seria necessari per a restablir la normoglucèmia.