

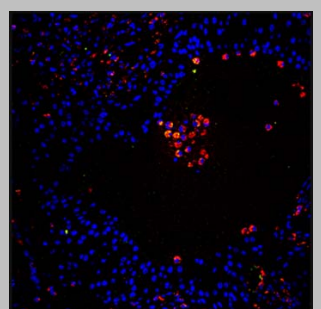
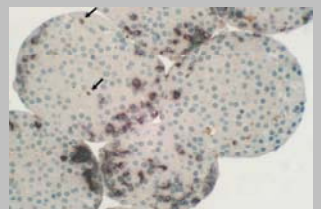
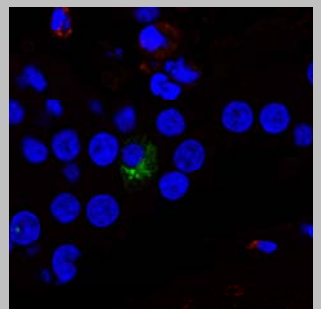
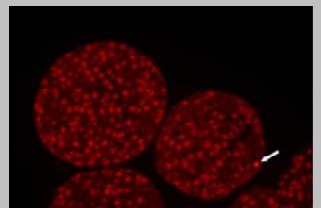
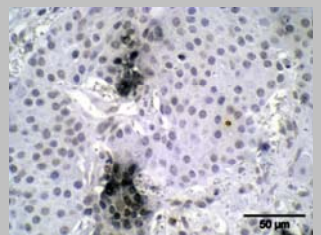
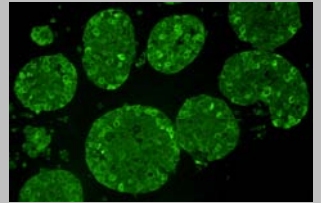
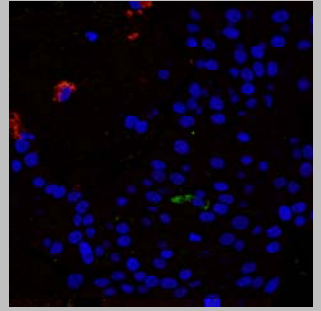
UNIVERSITAT DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES CLÍNiques

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

Marta Montolio Rusiñol

2006



INTRODUCCIÓ

1. DIABETIS MELLITUS

La diabetis mellitus és una malaltia heterogènia que té com a fet comú la hiperglucèmia que es produeix per diferents causes. En general, es caracteritza per una disminució de la secreció d'insulina i/o un augment de la resistència a la seva acció, resultant-ne un augment de la glucèmia en sang i trastorns en el metabolisme de lípids i de proteïnes. Els símptomes són els propis de la hiperglucèmia i inclouen poliúria, polidípsia, polifàgia i pèrdua de pes. La llarga evolució de la malaltia s'associa a complicacions microangiopàtiques oculars, renals i del sistema nerviós i també a lesions macrovasculars, de les quals les més característiques són la malaltia coronària i lesions en les extremitats inferiors.

La diabetis mellitus se subclassifica en tipus 1 (insulinodependent, IDDM), tipus 2 (insulinoindependent, IIDDM) dins de la qual es troba la diabetis insulinoindependent juvenil (MODY, de les sigles en anglès), secundàries, relacionada amb la malnutrició i associada a síndromes genètiques. De totes, la diabetis mellitus de tipus 1 i la de tipus 2 són les més abundants.

La diabetis mellitus tipus 1 representa un 10% de la diabetis en el món occidental. És una malaltia d'origen autoimmunitari en la qual es produeix la destrucció de les cèl·lules productores d'insulina. El dèficit de la insulina és el que provoca la hiperglucèmia i aquests pacients requereixen l'administració d'insulina exògena per tal de sobreviure.

La diabetis mellitus tipus 2 té una prevalença en la població molt alta que varia des del 2% en algunes zones de l'Índia rural, fins un 30% en algunes poblacions americanes i del Pacífic. En el món occidental té una prevalença del 6% i representa el 90% de la diabetis mellitus. És una malaltia multifactorial en la qual hi ha una resistència a l'acció de la insulina i una inadequada resposta compensatòria del pàncrees ja que es produeix una destrucció de les cèl·lules beta productores de la insulina. Els diabètics de tipus 2 poden regular la seva glucèmia controlant la seva dieta o bé usant hipoglucemians orals. Tot i això, en alguns casos pot ser necessari l'ús d'insulina exògena de manera aguda o bé crònica.

Encara que el pronòstic i el tractament ha millorat molt en els últims temps, la diabetis mellitus segueix sent una de les principals causes de morbiditat i mortalitat al món. L'any 2.000, la diabetis mellitus estava afectant a 171 milions de persones a tot el món i es calcula que aquest nombre augmentarà fins 366 milions de persones afectades en el 2.030 (Wild S i col., 2004).

1.1. Diabetis mellitus tipus 1 (o insulinodependent, IDDM)

La diabetis mellitus tipus 1 i tipus 2 són genètica i etiològicament diferents, però tenen mecanismes moleculars comuns que condueixen a la disfunció de les cèl·lules beta. En la de tipus 1 serien els mediadors immunològics i en la de tipus 2 factors metabòlics els que activarien vies de senyalització comunes que portarien a la destrucció de les cèl·lules beta.

La destrucció de les cèl·lules beta en la diabetis mellitus de tipus 1 és la conseqüència d'una reacció autoimmune contra les cèl·lules beta del pàncrees, que pot estar potenciada per factors ambientals o per la predisposició de l'individu. La malaltia es desenvolupa en dues fases: en la primera fase o insulinitis, els leucòcits envaeixen els illots i, en la segona fase la major part de les cèl·lules beta són destruïdes, principalment per apoptosi, la qual cosa fa que no es produeixi suficient insulina com per regular els nivells de glucosa i es doni la hiperglucèmia.

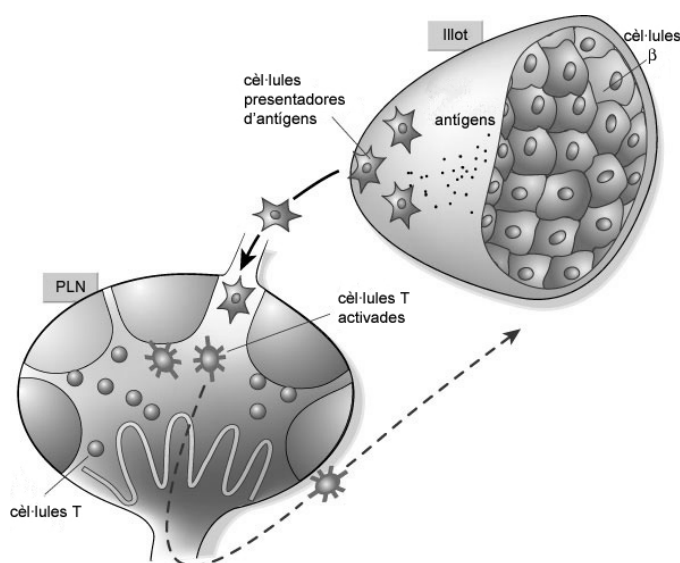


Figura 1. Esquema d'iniciació de la diabetis tipus 1. Els limfòcits T nadius circulen per la sang i els òrgans limfàtics, incloent-hi els nòduls limfàtics pancreàtics (PLN). En els nòduls es troben amb les cèl·lules presentadores d'antígens que porten els antígens derivats de cèl·lula beta i s'activen. Aquests limfòcits T activats passen a la circulació i accedeixen als diferents teixits, entre ells el pàncrees on es retroben amb els antígens, es reactiven i queden retinguts, iniciant la insulinitis. Esquema extret de Mathis D i col., 2001.

La major part dels leucòcits que infiltren els illots en la primera fase de la malaltia són limfòcits T (Tisch R i MacDevitt H, 1996; Bach JF i Mathis D, 1997). Normalment els limfòcits T no tenen

accés als teixits però circulen lliurement per la sang i per els òrgans limfàtics. Quan antígens derivats de la cèl·lula beta, com la insulina o la descarboxilasa de l'àcid glutàmic, són recollits per les cèl·lules presentadores d'antígens que es troben en l'illot, aquestes cèl·lules maduren i migren cap als nòduls limfàtics del pàncrees. És en el nòdul on les cèl·lules T entren en contacte amb els antígens derivats de la cèl·lula beta i s'activen. Com a part del procés d'activació els limfòcits T adquireixen la capacitat de migrar a través dels teixits, poden arribar als illots on retrobaran l'antigen, es reactivaran i quedaran retinguts, iniciant la insulinitis (Mathis D i col., 2001) (Figura 1). S'hipotetitzava que l'autoimmunitat es podria iniciar amb l'onada d'apoptosi neonatal que es produeix en la fase de remodelació d'òrgans (Finegood DT i col., 1995). Aquesta onada de mort de les cèl·lules beta és una font de presentació dels antígens al sistema immunològic. Aquest fet té conseqüències patològiques en aquells individus propensos a la diabetis, els quals tenen tot un conjunt de cèl·lules T autoreactives que s'activen davant dels antígens de la cèl·lula beta i que, a més, estan sotmesos a d'altres factors addicionals, com són la susceptibilitat genètica o ambiental.

Tot i que no està molt clar l'origen dels efectors immunològics que indueixen la mort en les cèl·lules beta i que acaben conduint a la diabetis tipus 1, s'han proposat dos mecanismes mitjançant els quals es pot estar produint la destrucció de les cèl·lules beta (Figura 2):

(a) La mort de la cèl·lula beta es produeix de manera **directa** mitjançant el reconeixement de l'antigen per part dels limfòcits T que són presentats per el complex major d'histocompatibilitat (de les sigles en anglès, MHC, *Major Histocompatibility Complex*) en la superfície de la cèl·lula beta. En aquest mecanisme es requereix el contacte cèl·lula T/cèl·lula beta que es pot donar per la via de la perforina (molècula associada als grànuls de les cèl·lules citotòxiques que s'insereix en la membrana de la cèl·lula diana on forma un porus i provoca la lisi osmòtica de la cèl·lula) i/o la interacció Fas–Fas lligand (Fas, és el receptor de membrana que principalment transmet els senyals de mort cap a l'interior de la cèl·lula) (Figura 2a).

(b) La mort per apoptosi es produeix de manera **indirecta**. La interacció es produeix entre els limfòcits T que estan infiltrant els illots i les cèl·lules presentadores d'antígens. Com a resultat d'aquesta interacció, els limfòcits T activats poden produir la mort a les cèl·lules beta properes o bé per la via directa de perforina i/o Fas–Fas lligand; o bé perquè la infiltració condueix a una resposta inflamatòria durant la qual s'alliberen citocines inflamatòries, com són IL-1, TNF- α , IFN- γ , IL-6 que s'acumulen en una alta concentració en el microambient de l'illot. Aquests mediadors inflamatoris poden ser produïts directament per els limfòcits T, o per els macròfags activats o, fins i tot, alguns d'ells per les mateixes cèl·lules beta. Totes aquestes citocines

sinèrgicament porten a l'activació de cascades apoptòtiques que acabaran causant la mort de les cèl·lules beta (Figura 2b).

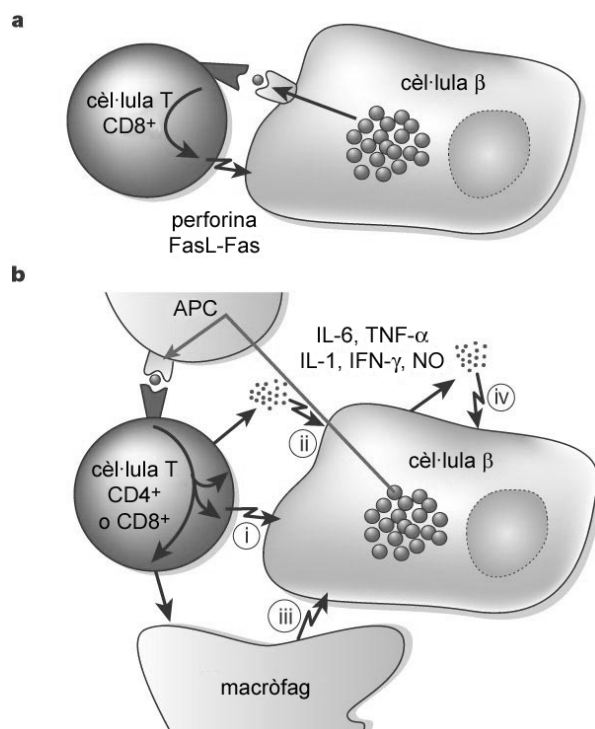


Figura 2. Mecanismes cel·lulars proposats per a la mort de les cèl·lules beta. **(a)** Es produeix el reconeixement directe dels antígens de la cèl·lula beta per part dels limfòcits T. L'activació de les cèl·lules T produeix la mort de la cèl·lula beta per el contacte cèl·lula-cèl·lula, usant la via de la perforina o de Fas-Fas lligand. **(b)** Les cèl·lules T reconeixen els antígens de les cèl·lules beta presentats indirectament per les cèl·lules presentadores d'antígens (APC). L'activació de les cèl·lules T condueix per diferents vies a la mort de la cèl·lula beta: (i) mitjançant els receptors de membrana, com són Fas i TNF-R; (ii) les cèl·lules T activades produeixen citocines i d'altres mediadors de mort solubles; (iii) l'activació dels macròfags i (iv) l'activació de les cèl·lules beta a produir mediadors de mort. Esquema extret de Mathis D i col., 2001.

Entendre el paper de cadascuna de les diferents citocines en la mort de les cèl·lules beta és difícil ja que aquestes citocines són produïdes per més d'un tipus cel·lular i tenen efecte sobre més d'una diana. També perquè poden actuar com a forma soluble (amb diferent rang d'activitats) o com a forma de membrana, i poden induir diferents receptors (amb diferents efectes). A més les citocines inflammatòries actuen com una xarxa de molècules interconnectades, en la qual les unes tenen influència sobre la síntesi i activitat de les altres (Mathis D i col., 2001).

1.2. Diabetis mellitus tipus 2 (o insulinoindependent, IIDDM)

Al contrari que la diabetis mellitus tipus 1, la tipus 2 no es considera una malaltia d'origen autoimmunitari. Es caracteritza per una resistència a l'acció de la insulina originada per diferents causes i una secreció d'insulina inadequada. La diabetis mellitus tipus 2 es produeix quan la resistència a la insulina no pot ser compensada degut a una inadequada secreció de la insulina i s'acaba produint el deteriorament de la funció de les cèl·lules beta (Kahn SE, 2001).

Les causes de la disfunció de les cèl·lules beta en la diabetis mellitus tipus 2 són varies: (a) l'**esgotament** de la cèl·lula beta degut a l'augment de la demanda secretora que es produeix per contrarestar la resistència a la insulina (DeFronzo RA i col., 1992); (b) la **desensibilització** de la cèl·lula beta deguda a les altes concentracions de glucosa (Yki-Järvinen H, 1992; Robertson RP i col., 1994); (c) la **lipotoxicitat** (Unger RH, 1995) i (d) la **reducció de la massa beta** (Kahn SE i col., 1999).

Durant els últims anys ha estat bastant discutit si a més a més de la funció beta també la massa de cèl·lules beta està disminuïda en la diabetis mellitus tipus 2. L'any 2003 es va publicar un estudi en el qual quedava demostrat que es produïa una disminució de la massa beta en pacients amb diabetis mellitus de tipus 2 (Butler AE i col., 2003). Butler i col·laboradors van estudiar un gran nombre de pàncrees humans obtinguts d'autòpsies. En l'estudi es va demostrar que els pàncrees de malalts de diabetis de tipus 2 presentaven un volum de cèl·lules beta reduït en comparació amb els volum de cèl·lules beta del pàncrees no diabètics. A més, també es va veure que la freqüència de cèl·lules beta apoptòtiques estava augmentada en els pàncrees de malalts de diabetis tipus 2. Aquestes dades suggereixen que el mecanisme a través del qual es redueix la massa beta en la diabetis tipus 2 és l'augment de l'apoptosi.

Així doncs, tot i que els dos tipus més freqüents de diabetis mellitus tinguin un origen diferent, finalment acaben compartint una característica comuna (encara que en el cas de la diabetis de tipus 2 pugui tenir un pes relatiu en el desenvolupament de la malaltia) que és la disminució de la massa de cèl·lules beta productores d'insulina.

2. MASSA CEL·LULAR BETA

La massa cel·lular beta del pàncrees, com en tots els teixits de l'organisme, està determinada per el balanç entre els processos de renovació i/o augment de cèl·lules i els de mort cel·lular. Els mecanismes que contribueixen al manteniment de la massa beta són aquells que fan augmentar la massa beta, com la formació de noves cèl·lules beta a partir de cèl·lules precursors o neogènesi, la replicació de les cèl·lules beta existents i els canvis en la mida i el volum cel·lular, i, d'altra banda, els mecanismes de reducció de la massa beta o mort cel·lular (Figura 3).

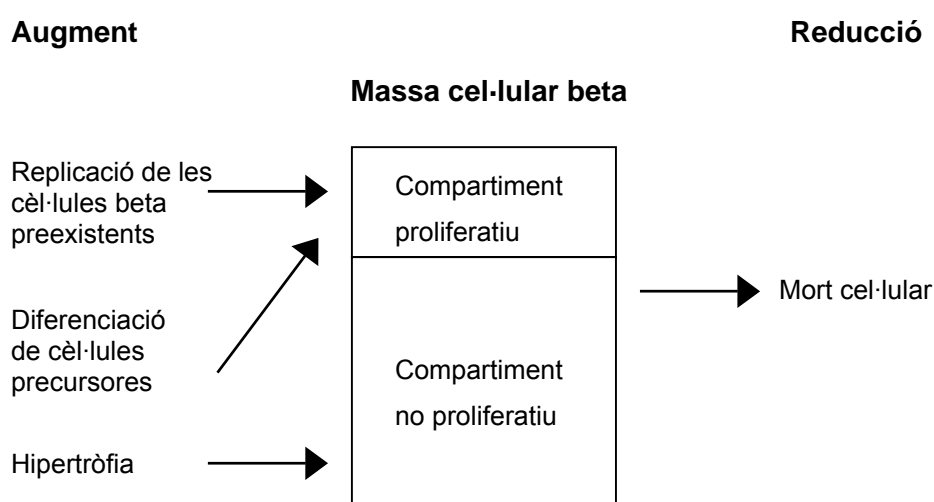


Figura 3. Esquema de l'estat dinàmic de la massa beta. El 97% de les cèl·lules beta de l'adult es troben en el compartiment no proliferatiu. La renovació de les cèl·lules en l'adult es deguda bàsicament a la replicació de les cèl·lules beta preexistents, però també es pot donar per la diferenciació de cèl·lules de l'adult que actuen com a precursors. La hipertròfia de les cèl·lules individuals fa augmentar la massa beta però no el nombre de cèl·lules. La mort de les cèl·lules beta és el mecanisme mitjançant el qual es produeix la reducció de la massa beta.

2.1. Renovació i augment de les cèl·lules beta

La diferenciació a partir de cèl·lules precursors o **neogènesi** és el mecanisme principal amb el qual es produeix l'augment de la massa de cèl·lules beta pancreàtiques durant l'etapa fetal (Pictet RL i col., 1972; Finegood DT i col., 1995). En canvi, en l'adult l'augment del nombre de cèl·lules beta es produeix bàsicament per la divisió de les cèl·lules preexistents. Tanmateix, en l'adult es creu que és una població de cèl·lules precursors pluripotents que en determinades ocasions poden diferenciar-se en cèl·lules de l'illot (Bonner-Weir S, 2000), hevent-se descrit

l'obtenció d'illots humans *in vitro*, a partir del cultiu de teixit ductal humà (Bonner-Weir S i col., 2000). Tot i aquest fet, hi ha estudis que indiquen que la contribució de les cèl·lules precursoras en la generació de noves cèl·lules beta en l'adult és molt poc important i que la **replicació** de les cèl·lules beta preexistents és el principal mecanisme per mantenir l'homeòstasi de la massa de cèl·lules beta durant la vida adulta (Dor Y i col., 2004).

La capacitat de replicació de les cèl·lules beta és màxima durant l'etapa fetal, moment en què aproximadament un 18% de les cèl·lules es troben en el compartiment proliferatiu, però després del naixement, aquesta capacitat disminueix dràsticament. En rates, als 3–4 mesos de vida només el 3% de les cèl·lules beta formen part del compartiment proliferatiu (en humans aquest percentatge encara és menor, i un ptatge inferior al 0.1% de les cèl·lules beta estan proliferant en l'adult (Butler AE i col., 2003)). En rosegadors, la resta de cèl·lules, el 97%, es troben en la fase de repòs (G_0) del cicle cel·lular i no poden incorporar-se de nou al cicle (Swenne I, 1983). Aquesta baixa taxa de replicació va fer creure que la massa beta en l'adult era fixa i que no variava des del moment del naixement, però poc a poc s'ha anat veient que la massa beta del pàncrees és dinàmica, continua creixent durant l'etapa adulta de manera paral·lela al pes corporal (Montanya E i col., 2000) i que té una gran capacitat d'adaptació davant dels canvis en la demanda metabòlica (Montaña E i col., 1994).

L'augment de massa al llarg de la vida és el resultat dels processos de neogènesi i proliferació que hem comentat però també intervé un **augment de la mida cel·lular** o **hipertròfia**. En rates, la mida individual de les cèl·lules beta augmenta durant els primers mesos de vida tot i que després es manté estable des del setè mes fins el quinzè per després tornar a augmentar al vintè mes de vida (Montanya E i col., 2000). Amb l'edat les cèl·lules beta poden perdre la seva capacitat funcional (de síntesi i secreció de la insulina) i també poden ser més susceptibles a patir danys. D'aquesta manera, les cèl·lules beta tindrien la seva capacitat de replicació limitada a un nombre determinat de replicacions després de les quals passarien a un estat de senescència. L'augment de la mida de la cèl·lula és un mecanisme prou eficient per a una compensació ràpida i transitòria, i així les cèl·lules beta poden usar aquest augment de la mida sense necessitat de replicar per a compensar d'una manera ràpida i transitòria la falta d'insulina (Bonner-Weir S, 2001). A més, la hipertròfia és el mecanisme mitjançant el qual es manté l'homeòstasi en l'adult quan la major part de les cèl·lules beta ja no repliquen (Montanya E i col., 2000). També s'ha observat que es produeix aquest fenomen en resposta a canvis en la demanda metabòlica. Per exemple per la infusió durant un curt temps (96 h) d'una solució de glucosa al 50% que comporta un augment del 50% de la massa de cèl·lules beta degut a un augment de la replicació i també a la hipertròfia de les cèl·lules beta (Bonner-Weir S i col., 1989). Un altre exemple on intervé la hipertròfia com a adaptació de les condicions fisiològiques

en les que es poden trobar les cèl·lules beta, és en el model de trasplantament d'illots pancreàtics (Montaña E i col., 1994).

2.2. Mort de les cèl·lules beta

Si en l'adult es donés una taxa de proliferació de només un 3% es podria duplicar o renovar totalment la massa beta del pàncrees en un mes. Per a que la massa beta es mantingui estable cal que la proliferació estigui contrarestada per la **mort cel·lular**. La mort cel·lular programada o apoptosi participa normalment en la renovació i el manteniment de tots els teixits de l'organisme, tant durant el desenvolupament com en l'etapa adulta.

L'apoptosi de les cèl·lules beta té un paper actiu en la regulació de la massa beta durant el període neonatal, quan s'ha observat que participa en la remodelació de la massa beta en els pàncrees de les rates de pocs dies de vida (13–17 dies) (Scaglia L i col., 1997). També es produeix un fenomen similar durant l'etapa postpart. Durant l'embaràs la massa beta augmenta un 50% degut a l'augment en la demanda metabòlica que es produeix. Un cop aquesta demanda metabòlica disminueix després del part, la massa beta retorna als seus nivells normals en els primers 10 dies. Un dels mecanismes que hi participen és un augment dels nivells d'apoptosi de les cèl·lules beta (Scaglia L i col., 1995).

Durant la vida adulta, i sense que es produeixin canvis fisiològics importants en l'individu, l'apoptosi de les cèl·lules beta es manté a nivells baixos i constants (Montanya E i col., 2000). Tot i això, l'apoptosi pot augmentar en determinats casos per a reduir el nombre de cèl·lules beta com a adaptació a una menor demanda metabòlica tal i com s'ha descrit en diferents models, com ara en el trasplantament d'insulinomes en rates (Blume N i col., 1995) o bé si es trasplanta un excés de massa beta (Montaña E i col., 1993). En el primer cas, es produeix l'atròfia de les cèl·lules beta del pàncrees del receptor de l'insulinoma per apoptosi. La hipoglucèmia perllongada i la hiperinsulinèmia que pateixen aquestes rates serien claus en la retroalimentació negativa que causa la inhibició de les cèl·lules beta i la seva destrucció. En el segon exemple, el trasplantament d'una massa beta en excés a ratolins C57BL/6 diabètics comporta una disminució de la massa trasplantada. Després del trasplantament, en els receptors normoglucèmics hi ha un excés de cèl·lules beta funcionals, les dels illots trasplantats i també les cèl·lules beta del pàncrees endogen. La reducció de la massa trasplantada es produeix com a resposta protectora davant l'alt risc de patir hipoglucèmies (Montaña E i col., 1993).

3. MORT CEL·LULAR

La mort de les cèl·lules es produeix per dos mecanismes principals: un procés que es considera passiu i que afecta a grups de cèl·lules, anomenat **necrosi** i un procés de mort programada, actiu, que afecta a la cèl·lula de manera individual, anomenat **apoptosi**. Durant els últims 30 anys la mort cel·lular s'ha classificat usant aquesta dicotomia tot i que cada vegada es tendeix a veure a aquests dos tipus de mort com els extrems de tot un ampli espectre de processos bioquímics i morfològics possibles que condueixen a la mort de la cèl·lula (Leist M i Nicotera P, 1997). Aquests tipus de mort cel·lular es poden donar de manera simultània en un mateix teixit davant el mateix estímul, però moltes vegades és la intensitat de l'estímul qui determina el procés que es produirà.

3.1. Necrosi

La necrosi es produeix com a resultat d'un dany sever i sobtat que afecta a tot un conjunt de cèl·lules o una zona de teixit. La necrosi es considera un procés accidental, una degradació incontrolada de la cèl·lula. Es caracteritza per canvis en l'estructura i morfologia de la cèl·lula que fan que la cèl·lula no pugui mantenir la seva homeòstasi (Figura 4). El primer canvi morfològic que es produeix és que els mitocondris s'inflen i es formen dipòsits de lipoproteïnes a la matriu mitocondrial, després hi ha una alteració de la membrana cel·lular que perd la seva capacitat de regulació de la pressió osmòtica, amb el trencament del balanç de calci, sodi i aigua. Com a conseqüència d'aquestes alteracions la cèl·lula s'infla i es produeix un xoc osmòtic. El trencament de la membrana comporta l'alliberament del contingut intracel·lular i la inflamació del teixit (Taula 1).

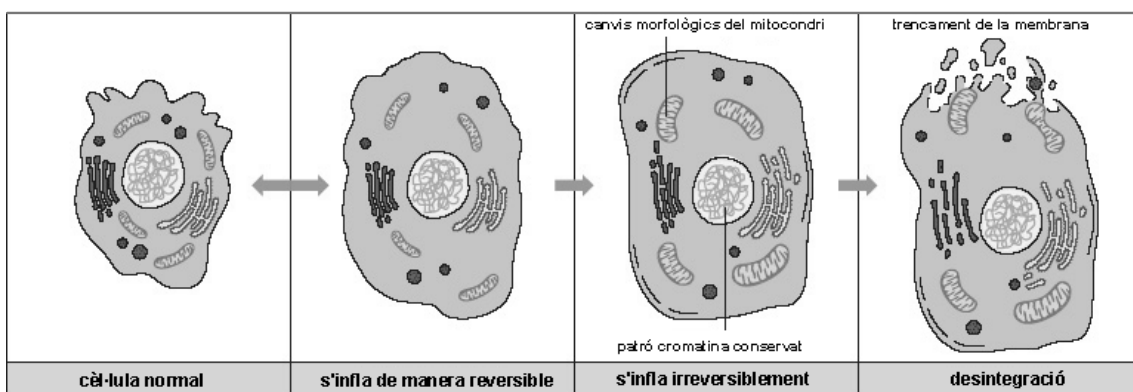


Figura 4. Canvis morfològics que es produeixen durant el procés de necrosi.

Els factors que poden induir la necrosi són, per exemple, la hipòxia greu, la isquèmia, factors que produeixin dany en la membrana cel·lular com poden ser diferents toxines, un trauma sobre el teixit, tòxics químics, metabòlits reactius d'oxigen o inhibidors de bombes d'ions (Cameron R i Feuer G, 2000).

3.2. Apoptosi

Per contra, l'apoptosi es considera un procés actiu de degradació de la cèl·lula. Comporta la síntesi *de novo* de diferents proteïnes i una molt acurada regulació del procés i, per tant, es requereix un alt consum d'ATP (Taula 1). Afecta a la cèl·lula de manera individual i sovint també se l'anomena "suïcidi cel·lular". Les característiques morfològiques que la caracteritzen i distingeixen de la necrosi són les següents (Cameron R i Feuer G, 2000) (Figura 5):

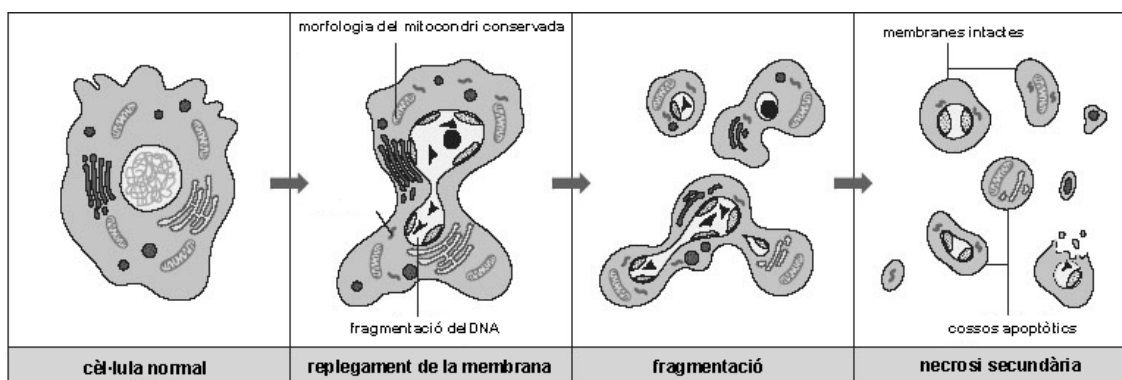


Figura 5. Canvis morfològics que es produeixen durant el procés d'apoptosi.

En una primera fase, es produeix la condensació i la fragmentació del DNA, que s'acumula a la perifèria del nucli i aquest redueix la seva mida. També es produeix una reducció del volum total de la cèl·lula i la compactació dels orgànuls citoplasmàtics. Els mitocondris, però, mantenen la seva estructura. En la segona fase del procés es produeix el replegament de la membrana sense que es doni el seu trencament, l'exposició de la fosfatidilserina cap a l'exterior de la membrana (característica que s'usa per a detectar l'apoptosi) i la formació dels cossos apoptòtics, és a dir, fragments cel·lulars embolcallats per membrana. Aquests cossos apoptòtics normalment són fagocitats per cèl·lules veïnes o macròfags evitant que es produeixi una resposta inflamatòria. En una tercera fase es produeix una degeneració d'aquests cossos apoptòtics que no han estat fagocitats, que recorda al procés de necrosi i que es coneix com a necrosi secundària.

Hi ha una gran varietat de factors que poden activar el procés d'apoptosi com, per exemple, diferents productes químics (radicals lliures d'oxigen, productes terapèutics), danys físics de la cèl·lula (rajos X, xoc tèrmic), d'altres cèl·lules (cèl·lules T), citocines (TNF- α) o la pèrdua de factors tròfics (hormones, IL-2, IL-3) (Hui H i col., 2004).

En la Taula 1 es resumeixen les característiques morfològiques que distingeixen la necrosi i l'apoptosi.

Taula 1. Característiques morfològiques de la necrosi i de l'apoptosi

| Necrosi | Apoptosi |
|--|--|
| Procés passiu | Procés actiu (consum ATP) |
| Afecta a grups de cèl·lules | Afecta a cèl·lules individuals |
| Pèrdua de la integritat de la membrana | Replegament de la membrana |
| Cèl·lula i mitocondris s'inflen | Condensació de nucli i citoplasma |
| Digestió del DNA a l'atzar | Fragmentació del DNA entre nucleosomes (fragments de 180 bp o múltiples) |
| Acaba amb la lisi de la cèl·lula | Acaba amb la formació de cossos apoptòtics |

3.2.1. Caspases

La major part dels canvis morfològics que s'observen en les cèl·lules apoptòtiques són deguts a l'activació específica d'unes proteases que contenen cisteïna, anomenades **caspases** (*Cysteine requiring ASPartate proteAse*). Les caspases estan altament conservades al llarg de l'evolució i són claus en el control i execució de l'apoptosi. Fins al moment se'n coneixen 14 de diferents que es poden classificar en diferents subfamílies depenent del criteri a partir del qual es faci la classificació. Una classificació molt usada basada en la seva activitat durant el procés que condueix a l'apoptosi, les divideix en dos grups: **iniciadores** (reben el senyal d'activació i comencen el procés) o **efectores** (són les que tallen els substrats, responsables de la morfologia final de la cèl·lula apoptòtica) (Thornberry N i Lazebnik Y, 1998).

Les caspases se sintetitzen com a proenzims inactius i cada procaspasa conté un pèptid amino-terminal de longitud variable (predomini). Aquests predominis contenen diferents

seqüències amb funcions reguladores importants per a l'activació de la mateixa caspasa. L'activació de les caspases es produeix quan es tallen per una zona específica que conté l'àcid aspàrtic (Cohen GM, 1997). Per a una correcta catàlisi cal el reconeixement de com a mínim 4 aminoàcids anteriors a l'àcid aspàrtic. El reconeixement dels diferents tetrapèptids és el que confereix especificitat a una caspasa i explica la diversitat en les seves funcions (Thornberry N i Lazebnik Y, 1998). Finalment, la caspasa és activa quan s'uneixen dos heterodímers formats per una subunitat gran i una de petita (Figura 6).

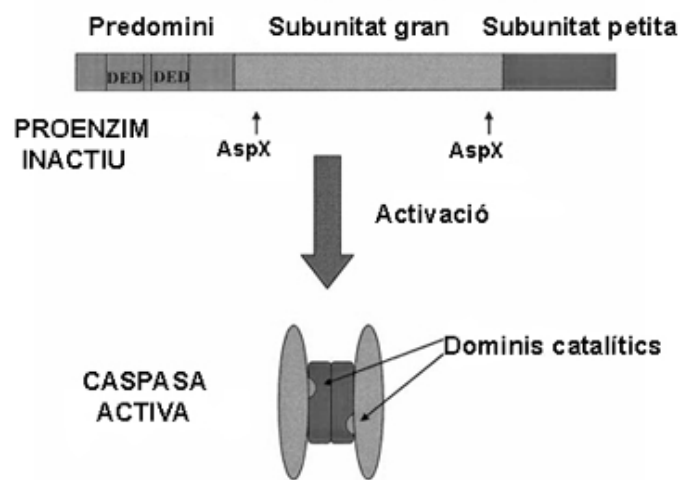


Figura 6. Estructura i activació de les caspases. La procaspasa és inactiva i conté tres dominis: el predomini, la subunitat gran i la subunitat petita. La llargada del predomini varia entre les diferents caspases. El proenzim es talla per les seqüències de tall (Asp-X) i dues subunitats grans i dues de petites es combinen per a formar l'enzim actiu. Extret de Hui H i col., 2004.

Les caspases s'activen unes a les altres produint una cascada d'activació fins a l'activació d'una caspasa efectora que talla els diferents substrats. El tall del substrat pot inactivar la proteïna diana (com en el cas de la PARP, enzim responsable de la reparació dels danys del DNA), o activar-ne altres (com per exemple, l'endonucleasa que produeix els fragments de DNA de 180 bp, o múltiples de 180 bp, característics de l'apoptosi; o l'activació de proteïnes de la via que porta a la condensació de la cromatina, o de les que destrueixen la làmina nuclear o el citoesquelet de la cèl·lula). Totes aquestes activacions i inactivacions de la maquinària proteica acaben produint la mort de la cèl·lula.

3.2.2. Vies apoptòtiques

En la cèl·lula de mamífer es considera que hi ha dues vies principals d'apoptosi: la via del receptor de mort o extrínseca i la del mitocondri o intrínseca (Figura 7) (Hengartner MO, 2000).

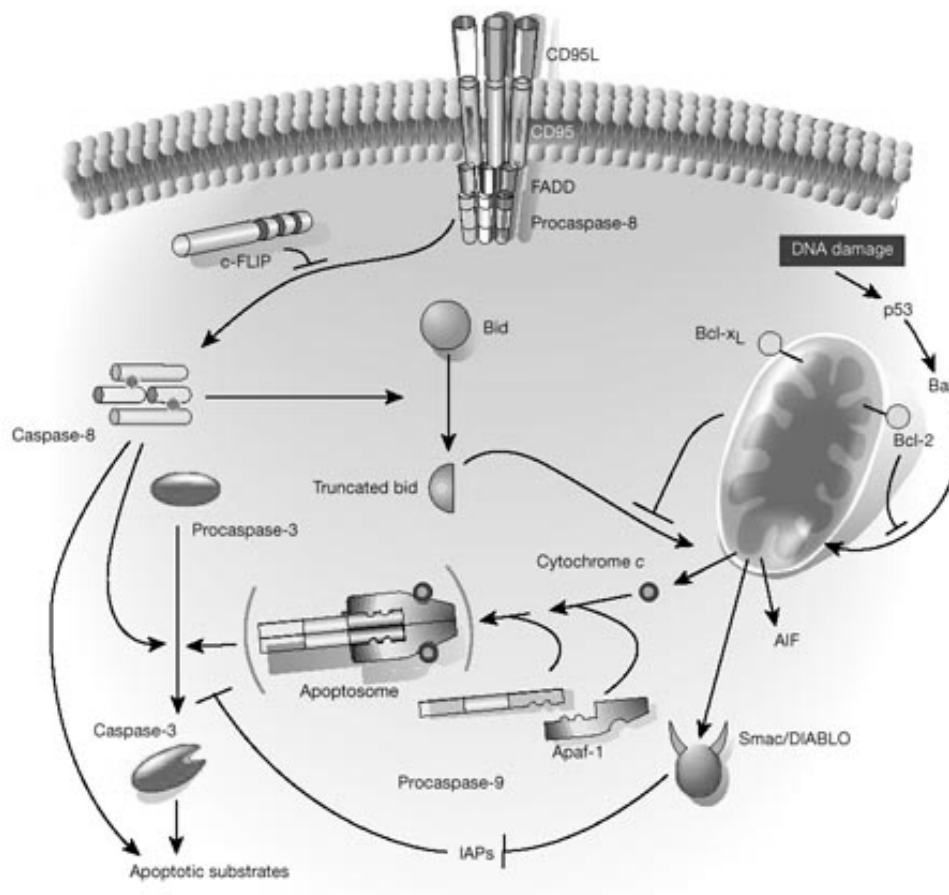


Figura 7. Principals vies apoptòtiques, via extrínseca i via intrínseca. CD95L(o FasL): Lligand del receptor CD95 (o Fas), FADD: Fas-Associated Death Domain protein (molècula adaptadora del receptor Fas), AIF:Apoptosis Inducing Factor, IAPs: Inhibitor of Apoptosis Proteins. Extret de Hengartner MO, 2000.

(a) **Via del receptor de mort o extrínseca.** Aquesta via s'activa per els membres de la família dels receptors de mort (com són Fas/CD95 o el receptor I de TNF). La unió del lligand de Fas/CD95 (FasL o CD95L) o de TNF fa que es reclutin d'altres receptors del mateix tipus i es formi un complex de senyalització de la inducció de la mort. Aquest complex, mitjançant la molècula adaptadora FADD (*Fas-associated death domain protein*), recluta múltiples molècules de procaspasa 8 (caspasa iniciadora), que s'activen unes a les altres. L'activació de la

caspara 8 es pot bloquejar per la unió amb un homòleg degenerat de les caspases c-FLIP (Irmeler M i col., 1997).

(b) **Via del mitocondri o intrínseca.** La via mitocondrial s'activa principalment com a resposta a alguns senyals extracel·lulars o a danys interns, com és el dany en el DNA (Rich T i col., 2000). Aquests diferents danys convergeixen en el mitocondri, normalment a través de l'activació d'un membre proapoptòtic de la família de Bcl-2 (família de proteïnes fonamental en la regulació de l'apoptosi). La major part de membres d'aquesta família de proteïnes, a diferència de Bcl-2 que es troba principalment unit a membranes intracel·lulars, passen del citosol a l'interior de l'orgànul (com per exemple, Bax, Bad, Bim i Bid) (Gross A i col., 1999; Li H i col., 1998; Wolter KG i col., 1997; Puthalakath H i col., 1999). Les formes citosòliques són inactives, però estan preparades per actuar immediatament. Els senyals proapoptòtics redirigeixen aquestes proteïnes cap al mitocondri, on s'acaba decidint el destí final de la cèl·lula amb el balanç de membres de la família de Bcl-2 pro- i antiapoptòtics.

Aquestes proteïnes pro- i antiapoptòtiques es troben en la superfície del mitocondri on competeixen per regular la sortida del citocrom c. Si el balanç es decanta cap als membres proapoptòtics s'alliberen tot un conjunt de molècules de l'interior del mitocondri. D'entre elles, una d'important és el citocrom c que, juntament amb Apaf-1, la procaspasa 9 (caspasa iniciadora) i potser d'altres proteïnes formen un complex anomenat apoptosoma. Així s'activa la caspasa 9 que alhora activa les caspases efectores. A més del citocrom c, durant l'apoptosi també s'alliberen del mitocondri d'altres molècules com l'adenilat ciclase, diferents caspases i el factor inductor d'apoptosi (AIF, *Apoptosis Inducing Factor*).

Les dues vies, l'extrínseca i la intrínseca convergeixen en l'activació de les caspases efectores (com la caspasa 3). L'activació de la caspasa 3 i la seva activitat és antagonitzada per els inhibidors de l'apoptosi (IAPs, *Inhibitors-of-apoptosis proteins*), que alhora són antagonitzats per Smac/DIABLO (una altra proteïna alliberada per el mitocondri). Després de l'activació de la caspasa 3 el programa apoptòtic se subdivideix en diferents programes, i la suma de tots ells resulta en el desmantellament i l'eliminació de la cèl·lula. La interacció i la integració de les dues vies es produeix mitjançant Bid, que és un membre proapoptòtic de la família de Bcl-2. La proteòlisi de Bid per part de la caspasa-8 augmenta la seva activitat proapoptòtica, que resulta en la seva translocació cap al mitocondri, on promou la sortida del citocrom c. En la majoria de les condicions fisiològiques en què es troba una cèl·lula la interacció entre les dues vies és mínima i les dues vies funcionen de manera independent (Gross A i col., 1999; Yin XM i col., 1999).

3.2.3. Reguladors de l'apoptosi

La **família de proteïnes de Bcl-2** tenen un paper important en la regulació del procés d'apoptosi. Està formada per una dotzena de proteïnes que es divideixen en tres grups, basant-se en les seves similituds estructurals i la seva funció. Les proteïnes que pertanyen al grup I, com Bcl-2 i Bcl-x_L, es consideren antiapoptòtiques; mentre que les del grup II, com Bax i Bad, i del grup III, Bid i Bik, es consideren promotores de l'apoptosi. La major part dels membres d'aquesta família poden homodimeritzar, però el fet important és que es poden formar heterodímers entre membres pro- i antiapoptòtics (Reed JC, 1997; Adams JM i Cory S, 1998; Antonsson B i Martinou JC, 2000) que resulten en la neutralització de les proteïnes. Així doncs, el balanç entre els membres pro- i antiapoptòtics determinarà el destí de les cèl·lules; les cèl·lules que contenen més proteïnes proapoptòtiques són més sensibles a la mort, mentre les que tenen un més alt contingut de proteïnes antiapoptòtiques són més resistents. La funció clau de les proteïnes d'aquesta família és la de regular l'alliberament de factors proapoptòtics, en particular del citocrom c, des del compartiment intermembrana del mitocondri cap al citosol (Adams JM i Cory S, 1998; Antonsson B i Martinou JC, 2000). Hi ha tres hipòtesis de com actuen per alliberar els factors proapoptòtics del mitocondri: o bé formant un canal d'ions en la membrana mitocondrial inserint-se en la bicapa lipídica; o bé reclutant d'altres proteïnes en un complex de proteïnes que formaran el porus; o bé directament, trencant l'homeòstasi del mitocondri que resulta en l'inflament de l'òrganul i el trencament del mitocondri (Hengartner MO, 2000).

D'altres proteïnes implicades en la regulació del cicle cel·lular també estan implicades en la regulació del procés apoptòtic. El protooncogen **c-myc** (Prendergast GC, 1999) i el gen supressor de tumors **p53** (Rich T i col., 2000) en diferents condicions poden induir l'apoptosi. D'altra banda, **A20** actua inhibint l'apoptosi induïda per les citocines (Grey ST i col., 1999).

3.2.4. Inhibidors de l'apoptosi

Ja que l'apoptosi és un fenomen que intervé en el desenvolupament de moltes malalties (o bé perquè no es produeix, com en el càncer, o bé perquè està augmentada, com en la diabetis mellitus o en malalties neurodegeneratives) s'han fet molts esforços per conèixer bé el procés i per estudiar molècules que la regulin.

Tenint en compte que les caspases són uns elements claus en el procés apoptòtic s'han convertit en dianes terapèutiques i moltes companyies farmacèutiques tenen programes per el

desenvolupament d'inhibidors de les caspases des que es va conèixer el seu paper central en l'apoptosi.

Els inhibidors de les caspases són normalment tri- o tetrapèptids amb alguna modificació. La seqüència peptídica marca la seva especificitat per inhibir una o altre caspasa i es correspon a la zona que reconeix i talla la caspasa. Per exemple, el tetrapèptid **YVAD** està basat en la seqüència YVHD que és la que talla la caspasa 1 per activar la pro-interleucina-1 β , i inactiva de manera selectiva la caspasa 1 i la 4. **DEVD** és la zona de tall de la PARP que reconeix i talla la caspasa 3, així DEVD és l'inhibidor específic de la caspasa 3 (Villa P i col., 1997). El tripètid **VAD**, no és tan específic per una caspasa en concret i es considera un inhibidor d'ampli espectre. La modificació del pèptid és la que conforma que la inhibició sigui reversible si són derivats aldehids, nitrils i cetones, o irreversible si la modificació consisteix en un grup diazometilcetones, aciloxometilcetones o halometilcetones (Garcia-Calvo M i col., 1998). Així es considera que Ac-YVAD.aldehid és un inhibidor reversible de les caspases 1 i 4, mentre z-VAD.fmk (fluorometilcetona) és un inhibidor irreversible de les caspases en general (o no selectiu).

L'ús d'aquests pèptids en línies cel·lulars ha permès conèixer millor el procés apoptòtic mediat per caspases i les vies apoptòtiques a través de les quals actua un determinat estímul apoptòtic (Slee EA i col., 1996; Inayat-Hussain SH i col., 1999). També s'han fet molts estudis preclínic amb aquests inhibidors de les caspases en models animals de diferents malalties. Tot i que amb aquests estudis no s'ha pogut dissecionar la contribució de cadascuna de les caspases al procés apoptòtic que es produeix en cada malaltia, ja que normalment s'han utilitzat inhibidors no selectius, sí que han ajudat a veure el potencial que pot tenir l'ús dels inhibidors de les caspases en algunes malalties. Per exemple, en models de dany per isquèmia-reperfusió hepàtic (Cursio R i col., 2000), cardíac (Mocanu MM i col., 2000), renal (Daemen MA i col., 1999), intestinal (Farber A i col., 1999) i cerebral (Cheng Y i col., 1998; Hara H i col., 1997). En aquests casos a més a més de disminuir l'apoptosi, es millora la supervivència, es disminueix el volum de l'infart i es millora la funció de l'òrgan. També s'han usat amb bons resultats en d'altres models animals en els quals intervé l'apoptosi, com són la lesió cerebral per traumatisme (Yakolev AG i col., 1997) i el parkinson (Cutillas B i col., 1999). També s'han usat en models animals de malalties infeccioses, com la meningitis bacteriana (Braun JS i col., 1999).

Tots aquests estudis fan pensar que els inhibidors de les caspases podrien usar-se com a teràpia per a moltes malalties, així com en el trasplantament d'òrgans sencers i en el trasplantament cel·lular. Per exemple, en un model de trasplantament de neurones

dopaminèrgiques en animals amb Parkinson l'ús de l'inhibidor Ac-YVAD.cmk redueix l'apoptosi i augmenta el nombre de cèl·lules trasplantades que sobreviuen en l'empelt, traduint-se en una millor recuperació dels animals amb Parkinson (Schierle GS i col., 1999).

L'inhibidor d'ampli espectre de les caspases z-VAD.fmk ha estat usat en diferents estudis *in vitro*, en illots fetals humans (Beattie GM i col., 2000) i en cèl·lules beta humanes purificades (Ris F i col., 2002) aconseguint una millora de la supervivència en cultiu, però fins al moment no s'ha comprovat la seva eficàcia sobre les cèl·lules dels illots *in vivo*.

3.3. Mort cel·lular beta

La mort de les cèl·lules beta pancreàtiques ha estat força estudiada ja que juga un paper molt important en el desenvolupament de la diabetis. Principalment s'ha estudiat en illots de rosegadors o en cèl·lules beta aïllades (Pipeleers D i col., 2001).

Diferents factors poden conduir la cèl·lula beta a la mort, com les citocines inflamatòries (Eizirik DL i Mandrup-Poulsen T, 2001), la presència del lligand de Fas (FasL) i del receptor (Fas) (Mathis D i col., 2001; Chervonsky AV i col., 1997), les altes concentracions de nutrients com la glucosa (fenomen anomenat glucotoxicitat) (Leibowitz G i col., 2001) i/o els àcids grassos (anomenat lipotoxicitat) (Lupi R i col., 2002) o la hipòxia (Giuliani M i col., 2005). Tots aquests senyals activen diferents vies en la cèl·lula que acaben produint la mort per apoptosi i/o necrosi de la cèl·lula beta (Figura 8).

3.3.1. Necrosi i cèl·lula beta

Molts dels estudis que hi ha sobre la mort de les cèl·lules beta s'han fet usant l'al·loxà o estreptozotocina. Aquestes substàncies són dues toxines diabetogèniques que causen la destrucció de les cèl·lules beta de rosegadors de manera ràpida i específica. En diferents experiments realitzats es comprova que les dues toxines causen la necrosi ràpida de manera específica sobre les cèl·lules beta i que la mort de les cèl·lules beta pot ser contrarestada si s'estimulen els mecanismes de defensa de la cèl·lula amb altes concentracions de glucosa (en el cas de l'al·loxà) o amb nicotinamida (en el de l'estreptozotocina) (Pipeleers D i col., 1986; Hoorens A i Pipeleers D, 1999). El mecanisme d'acció d'aquestes toxines és a través de la formació de radicals d'oxigen i/o la depleció d'ATP (Heller B i col. 1997; Heller B i col., 1995). Les cèl·lules beta són particularment vulnerables als radicals d'oxigen degut a la baixa activitat que presenten dels enzims que eliminen aquest tipus de radicals en aquestes cèl·lules (Robertson RP i col., 2005).

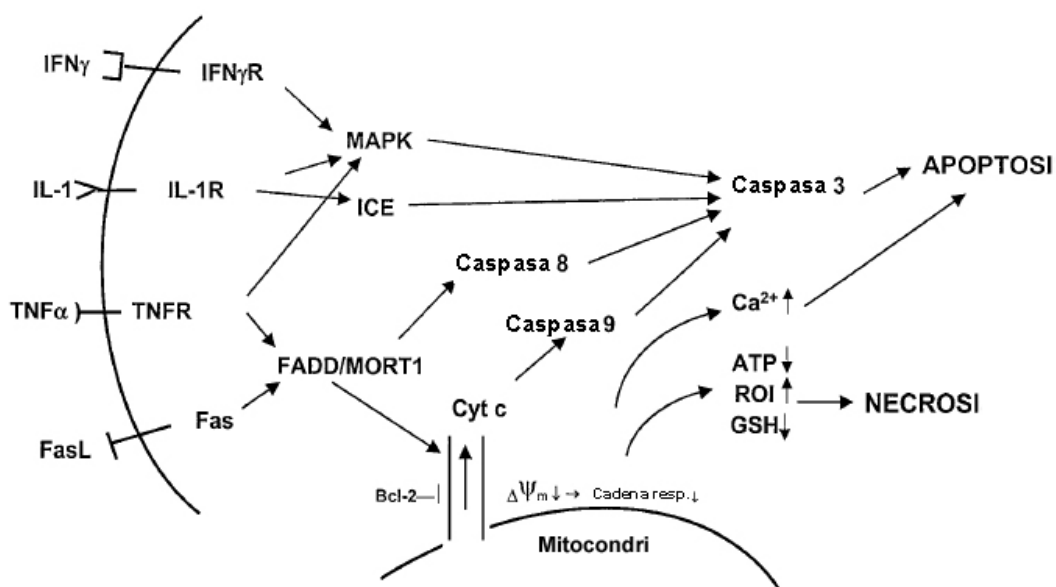


Figura 8. Senyals i vies de senyalització que es donen a la cèl·lula beta i que acabaran produint la mort de la cèl·lula, tant per apoptosi com per necrosi. Les citocines i el lligand de Fas (FasL) per diferents vies de senyalització acaben activant la cascada de caspases que donarà lloc a l'apoptosi. D'altra banda, TNF- α i FasL, a través de la seva acció a través dels receptors de mort (FADD/MORT1) acaben produint el desmantellament del mitocondri. Amb la sortida de citocrom c i del Ca⁺⁺ del mitocondri s'activa la cascada de caspases i finalment es produeix l'apoptosi, però al mitocondri també queda alterada la cadena respiratòria i la disminució de la producció d'ATP, la generació d'espècies reactives d'oxigen (ROI, de l'anglès *Reactive Oxygen Intermediates*) i la disminució del glutatió (GSH, que és un potent antioxidant) condueixen a la necrosi de la cèl·lula. Esquema extret de Eizirik DL i Mandrup-Poulsen T, 2001.

Les citocines, i en particular la IL-1 β , també produeixen la necrosi de les cèl·lules beta mitjançant la producció d'òxid nítric (NO, de les sigles de l'anglès: *nitric oxide*) com queda demostrat en animals modificats genèticament que no tenen la sintasa de l'òxid nítric induïble (iNOS, de l'anglès: *inducible nitric oxide synthase*). Quan cèl·lules beta d'aquests animals són exposades a citocines no es produeix la necrosi, mentre que l'apoptosi es continua produint, la qual cosa indica que la formació de NO és la responsable de la necrosi induïda per citocines en les cèl·lules beta (Liu D i col., 2000; Hoorens A i col., 2001). Les altes concentracions de NO produeixen necrosi en les cèl·lules beta tot i que no és un efecte específic sobre aquestes cèl·lules, ja que es produeix també en d'altres tipus cel·lulars de l'illot.

3.3.2. Apoptosi i cèl·lula beta

L'apoptosi de les cèl·lules beta ha estat força estudiada ja que es creu el tipus de mort principal responsable de la disminució de la massa beta que es produeix en els dos tipus de diabetis.

Els principals activadors de les vies apoptòtiques en les cèl·lules beta són la via Fas-FasL i les citocines (Eizirik DL i Mandrup-Poulsen T, 2001) (Figura 8). Fas és un receptor de mort de la família dels receptors de TNF. Quan FasL s'uneix al seu receptor (Fas) s'activa la caspasa-8 que a la seva vegada activa tota la cascada de les caspases i que acaba resultant en la mort per apoptosi de la cèl·lula beta. Els illots humans expressen de manera constitutiva FasL (Loweth AC i col., 1998), en els illots de rates Fas i FasL apareixen a partir dels sis mesos d'edat (Hanke J, 2000) i en els illots de ratolí. Signore i col. (1997) troben que FasL s'expressa en les cèl·lules alfa dels illots però no en les beta. Tot i que normalment les cèl·lules beta no presenten Fas, la seva expressió s'activa quan s'exposen a citocines (Suarez-Pinzon W i col., 1999; Stassi G i col., 1995) o a altes concentracions de glucosa, com es demostra en un estudi *in vitro* fet amb illots humans (Maedler K i Donath MY, 2004) o que en un altre estudi es trobés la presència de Fas en cèl·lules beta en pàncrees de diabètics de tipus 2 amb una pobra regulació de la seva glucèmia, mentre que no es va detectar Fas en pàncrees de donants normoglicèmics (Maedler K i col., 2001). Aquest augment de Fas en les cèl·lules beta dels illots fa que es produeixi l'apoptosi d'aquestes cèl·lules ja que el FasL expressat constitutivament en les cèl·lules veïnes interactua amb Fas i s'activa la via de les caspases (Maedler K i Donath MY, 2004).

A més a més del seu efecte sobre l'expressió de Fas, les citocines també tenen un efecte directe sobre l'apoptosi de les cèl·lules beta. Les citocines IL-1 β , TNF- α i IFN- γ a través de la unió amb el seu receptor, acaben activant també la cascada de les caspases i finalment l'apoptosi (Figura 8).

En la Figura 9 es mostra un possible model de les principals vies que contribueixen a executar l'apoptosi induïda per les citocines en la cèl·lula beta (Cnop M i col., 2005). Les tres vies principals són:

(a) **Activació de les proteïnes cinases:** la proteïna cinasa aminoterminal c-Jun activada per estrès (JNK), la proteïna cinasa p38 activada per mitògens (MAPK) i la cinasa regulada per senyals extracel·lulars (ERK). En cèl·lules beta exposades a IL-1 β es produeix un ràpid i sostingut augment de l'activitat de JNK, potenciat per la presència d'IFN- γ o TNF- α (Eizirik DL i Mandrup-Poulsen T, 2001; Donath MY i col., 2003). En un altre estudi fet en una línia de cèl·lules secretores d'insulina tractades amb inhibidors de JNK es detecta una protecció davant de l'apoptosi induïda per citocines (Bonny C i col., 2001), suggerint-ne el paper de JNK en aquesta via. A més d'aquesta activació, també s'ha observat l'activació de p38 MAPK i d'ERK, i com la inhibició d'aquestes MAPKs redueix la mort de les cèl·lules d'illots de rata (Larsen CM i col., 1998; Saldeen J i col., 2001).

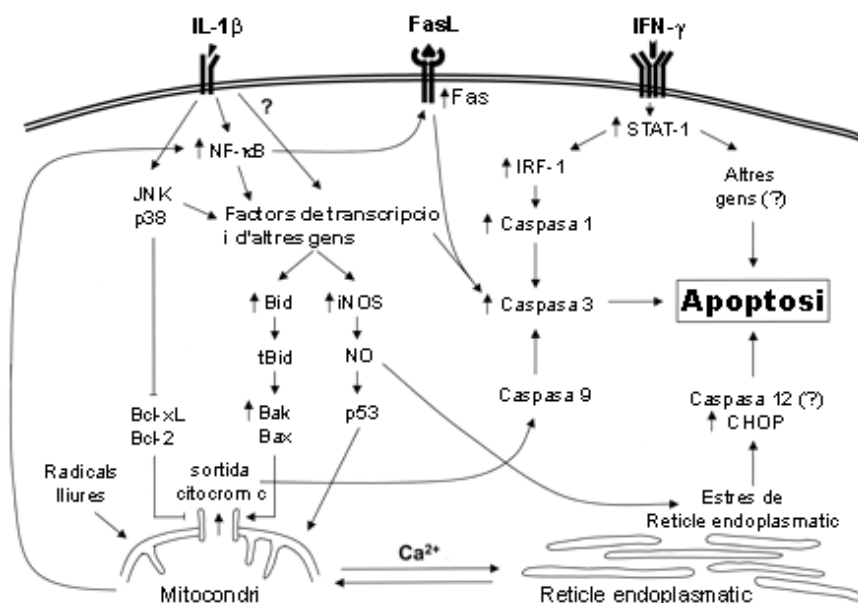


Figura 9. Model proposat per Cnop M i col. (2005) de les diferents vies que contribueixen a l'execució de l'apoptosi induïda per citocines en la cèl·lula beta. Probablement s'indueixen les tres vies: la de JNK, la d'estrès del reticle endoplasmàtic i la de l'alliberació de proteïnes proapoptòtiques del mitocondri. Esquema extret de Cnop M i col., 2005.

(b) **Estrès de reticle endoplasmàtic.** La disrupció de l'homeòstasi del reticle endoplasmàtic, per exemple per un canvi en les concentracions de Ca^{++} del reticle, produeix una acumulació de proteïnes no plegades en la cèl·lula que provoca una resposta específica anomenada resposta a l'estrès del reticle endoplasmàtic (Schroder M i Kaufman RJ, 2005). Aquesta resposta és un intent coordinat per a restablir l'homeòstasi i la funció de la cèl·lula, que inclou una disminució de la traducció de proteïnes, l'augment de proteïnes de plegament que ajudaran a plegar les proteïnes acumulades a la cèl·lula per a que agafin la seva conformació activa, i la degradació de les proteïnes mal plegades. Si l'estrès del reticle endoplasmàtic s'allarga, s'activa el programa d'apoptosi de la cèl·lula a través de la caspasa 12 (Schroder M i Kaufman RJ, 2005). Les cèl·lules beta són especialment sensibles a l'estrès del reticle endoplasmàtic degut a la seva alta taxa de síntesi proteica (Harding HP i col., 2001).

(c) **Alliberament de senyals de mort cel·lular des del mitocondri.** Els membres de la família de Bcl-2 són qui regulen la resposta mitocondrial als senyals proapoptòtics, impeding la sortida de citocrom c al citosol i l'activació de la caspasa 9 i de la caspasa 3 (Hengartner MO, 2000). En diferents estudis s'ha comprovat que la sobreexpressió de Bcl-2 protegeix, tot i que de manera parcial, l'apoptosi induïda per citocines en illots de ratolí (Iwahasi H i col., 1996) i en illots humans (Rabinovitch i col., 1999). Hi ha d'altres gens proapoptòtics que presenten la seva expressió augmentada en resposta a les citocines, com són Bid, Bak i la caspasa 3 (Kutlu B i col., 2003).

4. GLUCOSA I CÈL·LULA BETA

La glucosa és el principal regulador de la funció de la cèl·lula beta. La metabolització de la glucosa en la cèl·lula beta pancreàtica comporta la generació d'ATP, el tancament dels canals de potassi dependents de voltatge, la despolarització de la membrana plasmàtica, l'obertura dels canals de Ca^{++} i amb això, la secreció d'insulina (Efendic S i col., 1991). Però l'exposició a altes concentracions de glucosa durant un determinat període de temps comporta la disfunció de la cèl·lula beta, alterant la síntesi i la secreció d'insulina (Pitout V i Robertson RP, 2002). Els efectes adversos de la hiperglucèmia engloben tres mecanismes diferents: (a) la desensibilització a la glucosa, (b) l'exhauriment de la cèl·lula beta i (c) la glucotoxicitat.

(a) **Desensibilització a la glucosa.** És un mecanisme adaptatiu davant d'una curta exposició a elevades concentracions de glucosa que produeix una inhibició ràpida i reversible de l'exocitosi en la cèl·lula beta. Quedà demostrat en uns estudis amb la línia cel·lular HIT-T15, on l'exposició a polsos curts i repetits d'altres concentracions de glucosa feia que les cèl·lules no responguessin a la glucosa, però quan les cèl·lules es cultivaven sense glucosa la resposta a la glucosa es recuperava. Aquest fet no es produïa per exhauriment de la cèl·lula perquè en inhibir la secreció d'insulina, la pèrdua de resposta a la glucosa se seguia produint (Kilpatrick ED i Robertson RP, 1998).

(b) **Exhauriment de la cèl·lula beta.** Es refereix a l'esgotament de les reserves d'insulina intracel·lulars després de l'exposició perllongada a un secretagog. En rates pancreatectomitzades al 90% la secreció d'insulina en resposta a altes concentracions de glucosa disminueix en un 75% després de dues–tres setmanes de la cirurgia. Si s'administra un inhibidor de la secreció d'insulina al mateix temps, la resposta a la glucosa es recupera parcialment, indicant que la causa de la pèrdua de resposta a la glucosa, en aquest cas, es produeix per l'excessiva secreció d'insulina induïda per la hiperglucèmia (Leahy JL i col., 1994).

(c) **Glucotoxicitat.** Són els efectes irreversibles que es produeixen de manera lenta i progressiva en la funció i la supervivència de les cèl·lules beta exposades a altes concentracions de glucosa de manera perllongada. Els efectes deleteris sobre la funció de les cèl·lules beta es produeixen sobre l'expressió del gen de la insulina i sobre la seva secreció. L'exposició crònica de les cèl·lules beta a nivells suprafisiològics de glucosa disminueix els nivells de mRNA d'insulina (Olson LK i col., 1993; Briaud I i col., 1999) i aquesta disminució està associada a una menor activitat del principal factor de transcripció de la insulina, PDX-1 (Pancreatic-duodenum homeobox-1) (Olson LK i col., 1993; Olson LK i col, 1995.). El contingut d'insulina de la cèl·lula i la secreció estimulada per glucosa de la insulina també estan disminuïts en les cèl·lules beta exposades a altes concentracions de glucosa durant un període

de temps perllongat. La generació d'espècies reactives d'oxigen durant la metabolització de la glucosa és un dels mecanismes d'acció de la glucotoxicitat, ja que els efectes deleteris sobre el contingut i la secreció d'insulina es poden revertir parcialment amb l'ús d'antioxidants (Tanaka Y i col., 1999; Tanaka Y i col., 2002).

A més de la funció, l'exposició durant llargs períodes de temps a altes concentracions de glucosa també altera la supervivència de la cèl·lula beta, promovent la mort cel·lular per apoptosi. Els illots de *Psammomys obesus*, un model animal de diabetis mellitus de tipus 2, cultivats durant 10 dies a altes concentracions de glucosa presenten una elevada apoptosi quan es comparen amb els que han estat cultivats el mateix temps a baixes concentracions de glucosa. *In vivo*, durant la inducció de la diabetis (amb una dieta hipercalòrica) també s'observa un augment de l'apoptosi en els illots de *P. obesus* (Donath MY i col., 1999). En estudis *in vitro* amb illots humans s'ha pogut observar que les altes concentracions de glucosa també fan augmentar la mort per apoptosi de les cèl·lules de l'illot (Federici M i col., 2001; Maedler K i col., 2001). Les altes concentracions de glucosa alteren el balanç de membres pro- i antiapoptòtics de la família de Bcl-2 fent decantar el balanç cap als membres proapoptòtics (Federici M i col., 2001). En un altre estudi s'ha vist com les altes concentracions de glucosa fan augmentar l'expressió de Fas en illots humans *in vitro*, conduint a l'activació de les caspases 8 i 3 i a l'apoptosi. Normalment els illots humans expressen el lligand de Fas, però no el receptor, i en aquest mateix estudi es va observar que en les cèl·lules beta de pacients diabètics de tipus 2 hi havia Fas mentre que no es trobava en els controls normoglicèmics (Maedler K i col., 2001). Més tard, aquest mateix grup va descriure que la IL-1 β secretada per les cèl·lules beta en resposta a les altes concentracions de glucosa era qui mediava els efectes deleteris de la glucosa sobre les cèl·lules beta (Maedler K i col., 2002). Aquest últim punt, però, no està del tot acceptat ja que hi ha dades a la bibliografia que el contradiuen, i s'ha vist com l'exposició a altes concentracions de glucosa no estimula la producció i secreció de la IL-1 β en illots de rata (Elouil H i col., 2005), ni tampoc en illots humans (Welsh N i col., 2005).

5. CITOCINES

Les citocines són les molècules peptídiques reguladores i mediadores de la resposta immunològica i com a tal tenen un paper força important en el desenvolupament de diferents malalties immunològiques i d'entre elles la diabetis mellitus de tipus 1, també estan implicades en els processos de rebuig en el xenotrasplantament dels illots, en la recurrència del trasplantament, i també en la pèrdua inicial de funció i massa en el trasplantament d'illots.

5.1. Classificació de les citocines

Clàssicament les citocines es divideixen en dos grups depenent de la població de cèl·lules T ajudants (*T helper cells*, Th) que les sintetitzi. Els patrons Th1 i Th2 es van descriure inicialment per al ratolí (Mossmann TR i col., 1986) i més tard per als humans. Les cèl·lules Th1 de ratolí produeixen: IL-2, IFN- γ i TNF- β ; mentre que les Th2 produeixen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 i IL-13. Els clons Th1 i Th2 en humans produeixen un patró molt similar tot i que la síntesi de IL-2, IL-6, IL-10 i IL-13 no està restringida a una sola de les poblacions cel·lulars.

Les funcions de les cèl·lules Th1 i Th2 es corresponen amb la de les citocines que sintetitzen. Les citocines Th1 (IL-2, IFN- γ i TNF- β) activen la resposta immunològica mediada per cèl·lules, com per exemple les respostes citotòxiques i inflamatories mitjançades per les cèl·lules T, cèl·lules assassines naturals (*Natural Killer cell*, NK cell) i macròfags. En canvi, les citocines de tipus Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 i IL-13) activen la resposta humoral (activant, per exemple, la producció d'anticossos de les cèl·lules B) i també augmenten la proliferació i la funcionalitat dels eosinòfils. Normalment els productes d'una de les poblacions de les cèl·lules Th inhibeix la diferenciació i la funció de l'altra.

Tot i aquesta divisió, cal tenir en compte que la majoria de les citocines poden ser sintetitzades per més d'un tipus cel·lular. A més de poder-les produir les cèl·lules CD4⁺ (Th) també les poden sintetitzar d'altres cèl·lules del sistema immunològic, com els macròfags, les cèl·lules CD8⁺ (cèl·lules T citotòxiques o Tc) i les cèl·lules NK; o bé d'altres cèl·lules que no corresponen al sistema immunològic com poden ser les cèl·lules endotelials, els fibroblasts, cèl·lules del múscul llis i les cèl·lules beta pancreàtiques. Així doncs, una altra classificació de les citocines pot ser basant-se en la resposta que modula més que en el tipus de cèl·lula T que la produeix. D'aquesta manera les citocines de tipus 1 són les que principalment estimulen la immunitat mediada per cèl·lules; les citocines de tipus 2 les que indueixen la immunitat humoral i inhibeixen la immunitat mediada per cèl·lules i les de tipus 3 (TGF- β) que també disminueixen

la immunitat mediada per cèl·lules. Les citocines que són sintetitzades i secretades, de manera més important però no únicament, per macròfags (IL-1 α , IL- β , TNF- α i IFN- α) es consideren les citocines proinflamatòries (Rabinovitch A, 1998).

5.2. Citocines i diabetis mellitus

5.2.1. Citocines i diabetis mellitus de tipus 1

Les citocines tenen un paper molt important en el desenvolupament de la diabetis mellitus de tipus 1, com ja ha quedat explicat en l'apartat 1.1. La predisposició genètica i els factors ambientals són els responsables de la direcció que prendrà la resposta immunològica (patogènica o protectora) (Figura 10).

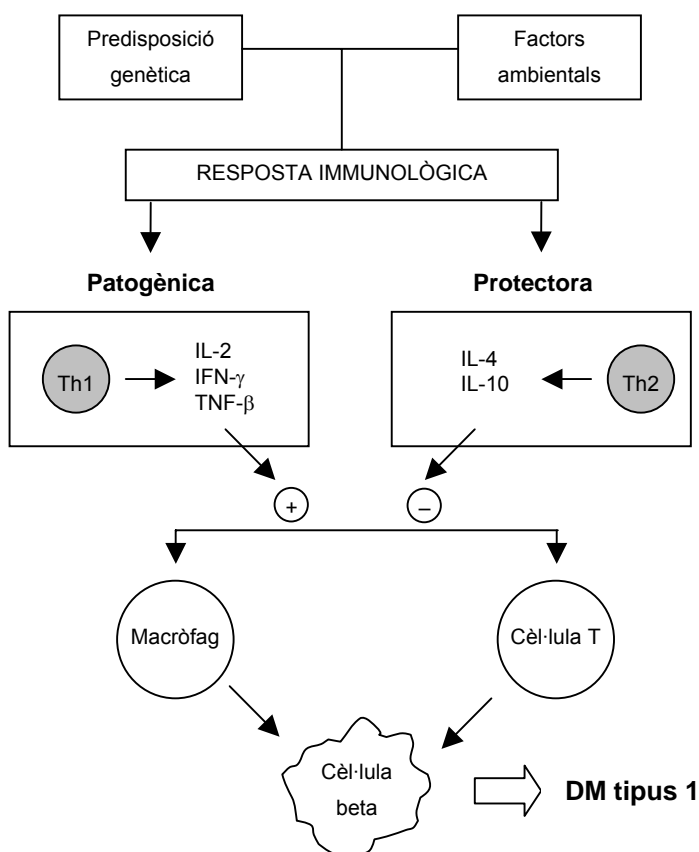


Figura 10. Patogènesi de la diabetis mellitus de tipus 1. Els factors ambientals i genètics són els que condicionen l'aparició de la malaltia, depenent de quin tipus de cèl·lules Th s'activin. Si s'activen les cèl·lules Th1, aquestes a través de les citocines secretades activaran els macròfags i les cèl·lules T que destruiran les cèl·lules beta a través dels seus productes (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ). Si s'activen les cèl·lules Th2 a través dels seus productes IL-4 i IL-10 impedeixen l'activació de les Th1 i el desenvolupament de la diabetis mellitus de tipus 1. Esquema extret de Rabinovitch A i Suarez-Pinzon WL, 1998.

La resposta immunològica que condueix a la destrucció de les cèl·lules beta i la diabetis mellitus tipus 1 està mediada per cèl·lules T autoreactives contra els antígens de les cèl·lules beta de l'illot. Una de les hipòtesis és que aquesta resposta està mediada per les cèl·lules Th1 i les citocines produïdes per aquest tipus cel·lular, mentre que la resposta protectora està mediada per les cèl·lules Th2 que produeixen IL-4 i IL-10. Així doncs, les cèl·lules Th1 i les citocines produïdes, IL-2, IFN- γ , TNF- β , activen als macròfags i a les cèl·lules T citotòxiques a produir citocines proinflamatòries (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) i destruir les cèl·lules beta, causant la diabetis mellitus de tipus 1, mentre que les cèl·lules Th2 i els seus productes, IL-4 i IL-10 inhibeixen les cèl·lules Th1 i la producció de citocines, impeding el desenvolupament de la diabetis mellitus de tipus 1 (Rabinovitch A i Suarez-Pinzon WL, 1998).

5.2.2. Citocines i diabetis mellitus de tipus 2

Tot i que no es considera que la diabetis mellitus de tipus 2 sigui una malaltia d'origen autoimmune, cada vegada pren més importància el fet que diferents mediadors inflamatoris puguin estar implicats en el desenvolupament d'aquesta malaltia.

En diferents estudis s'ha vist que l'augment de la secreció i l'activitat de les citocines proinflamatòries participarien en els processos de resistència a la insulina i l'aterosclerosi (Dandona P i Aljada A, 2002; Marette A, 2002; Muller S i col., 2002). Les citocines alteren la funció i fan augmentar la mort de les cèl·lules beta, així doncs, l'augment crònic dels mediadors inflamatoris que s'observa en la diabetis mellitus de tipus 2 pot afectar, a més a més dels teixits sensibles a la insulina i els vasos sanguinis, a les cèl·lules beta pancreàtiques.

Les diferents causes de l'augment de mediadors inflamatoris en la diabetis mellitus de tipus 2 poden ser les següents:

(a) El teixit adipós pot produir diferents hormones i citocines amb propietats auto/paracrines importants, però també pot alliberar-ne algunes a la circulació i tenir efectes endocrins, com per exemple la leptina, TNF- α , IL-6 i l'antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra, *IL-1 receptor antagonist*) (Fried SK i col., 1998; Hotamisligil GS i col., 1995; Meier CA i col., 2002). Els nivells d'expressió d'aquests factors estan augmentats en l'obesitat i relacionats amb la resistència a la insulina. A més d'afectar als teixits sensibles a la insulina, aquests factors també poden actuar sobre la cèl·lula beta, alterant la seva funció i supervivència (Donath MY i col., 2003).

(b) L'obesitat també està associada amb canvis dels nivells de nutrients en plasma: els nivells d'àcids grassos estan augmentats i la resistència a la insulina fa disminuir la captació de glucosa, fent que es produeixi la hiperglucèmia post-pandrial. Els dos nutrients interfereixen en el recanvi i la funció de les cèl·lules beta, influint en el desenvolupament de la diabetis de tipus 2. Els àcids grassos són tòxics per a la cèl·lula beta (lipotoxicitat), causant-ne l'apoptosi, però no intervenen en el procés d'inflamació (Donath MY i col., 2003). En canvi en illots humans ha estat descrit que la glucosa indueix la disfunció i l'apoptosi en les cèl·lules beta a través de la producció i secreció de IL-1 β per part de la pròpia cèl·lula beta (Maedler K i col., 2002), si bé d'altres grups no han pogut confirmar aquest resultat (Welsh N i col., 2005).

(c) Els macròfags i les cèl·lules endotelials també poden contribuir a augmentar els nivells de IL-1 β , IL-6 i TNF- α que es troben en el plasma dels pacients de diabetis mellitus de tipus 2 (Pickup JC i Crook MA, 1998). Aquestes citocines poden actuar sobre els illots pancreàtics i alterar la secreció d'insulina.

(d) L'autoimmunitat també pot intervenir en la diabetis mellitus de tipus 2. Per exemple, la presència de cèl·lules apoptòtiques degut als alts nivells de glucosa i àcids grassos, podria provocar la mobilització de cèl·lules T reactivas contra els antígens de les cèl·lules beta pancreàtiques, acabant amb la destrucció de les cèl·lules beta (Donath MY i col., 2003).

5.3. Efectes de les citocines sobre la cèl·lula beta

Es coneixen bé els efectes que les citocines tenen sobre els illots pancreàtics degut als nombrosos estudis que s'han fet amb els illots *in vitro*.

Les citocines proinflamatòries (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ) i TNF- β tenen un efecte citotòxic sobre les cèl·lules beta: inhibeixen la síntesi i secreció d'insulina, tot i que aquestes funcions es poden recuperar quan es retiren les citocines. A més, les citocines proinflamatòries destrueixen la cèl·lula beta, normalment quan s'usen en combinació (Rabinovitch A i Suarez-Pinzon WL, 2003). Els illots humans semblen menys sensibles que els de rata a aquests efectes ja que es requereix de la presència de les tres citocines proinflamatòries alhora per a causar el dany funcional i la mort de les cèl·lules beta (Eizirik DL i Darville MI, 2001).

Les citocines causen la mort en la cèl·lula beta tant per apoptosi com per necrosi com ja s'ha explicat en l'apartat 3.3 (Figura 8). L'efecte és diferent, segons si és sobre cèl·lules beta aïllades o sobre tot l'illot sencer. En cèl·lules beta de rosegadors aïllades el tipus de mort que

predomina és l'apoptosi (Liu D i col., 2000; Hoorens A i col., 2001), quan és l'illot sencer el que s'exposa a les citocines augmenta principalment la necrosi, mentre que l'apoptosi ho fa en menor grau (Saldeen J, 2000). Això fa pensar que la formació d'òxid nítric (NO) és més important en el cas dels illots sencers que no en les cèl·lules aïllades, ja que en l'illot sencer es produïrien unes concentracions de NO locals més altes que en les cèl·lules aïllades (Hoorens A i col., 2001). El fet que en cèl·lules beta purificades de ratolins *iNOS*^{-/-} exposades a citocines presentin un menor grau de necrosi que la que pateixen les cèl·lules beta de ratolins salvatges i que el grau d'apoptosi no es vegi alterat (Liu D i col., 2000), fa pensar que la forma induïble de l'enzim òxid nítric sintasa (*iNOS*) té un paper molt important en aquesta necrosi induïda per citocines en cèl·lules beta de rosegadors. A més, en illots sencers d'aquests mateixos ratolins *iNOS*^{-/-} exposats a citocines també es pot observar que la mort cel·lular està disminuïda, mostrant el paper de l'*iNOS* en la mort de les cèl·lules beta de rosegadors.

En el cas dels illots humans, cal la combinació de dues o més citocines proinflamàtores (IL-1 β + IFN- γ o IL-1 β + IFN- γ + TNF- α) per produir els efectes deleteris sobre la funció i la mort de les cèl·lules beta que es produeix principalment per apoptosi (Eizirik DL i col., 1994). En els illots humans la necrosi no està augmentada i l'NO no juga cap paper en la mort de les cèl·lules beta, com demostra que l'ús d'inhibidors de l'*iNOS* no tinguin cap efecte inhibint l'apoptosi en els illots humans exposats a citocines (Delaney CA i col., 1997).

Així doncs, tot i que tant els illots de rosegadors com humans, produeixen quantitats similars d'NO en resposta a citocines, sembla que la seva contribució sobre la mort de les cèl·lules és més important en el cas dels rosegadors que en el dels illots humans (Eizirik DL i Mandrup-Poulsen T, 2001). I en el cas dels rosegadors el seu paper és força important augmentant la component necròtica. La progressió cap a apoptosi o necrosi depèn del contingut d'ATP de la cèl·lula: si el contingut d'ATP de la cèl·lula disminueix per sota del mínim necessari per a que es produeixi l'apoptosi, el tipus de mort que es produirà serà la necrosi, mentre que si els nivells d'ATP estan preservats, encara que només sigui parcialment, la mort de la cèl·lula es produirà per apoptosi (Eizirik DL i Darville MI, 2001) (Figura 11). En els illots de ratolí exposats a citocines es produeix una disminució d'un 70% en l'oxidació de glucosa que no es dona quan s'usa un inhibidor de l'*iNOS* (Eizirik DL i Pavlovic D, 1997; Cetkovic-Cvrlje M i Eizirik DL, 1994). En canvi, en els illots humans exposats a citocines no es produeix aquest efecte sobre l'oxidació de glucosa (Eizirik DL i Darville MI, 2001) probablement degut a que les cèl·lules dels illots humans tenen uns millors mecanismes de defensa contra l'estrès oxidatiu (Welsh N i col., 1995). El manteniment de la funció mitocondrial permet mantenir la producció d'ATP de la cèl·lula, fent que hi hagi suficient ATP com per a que totes les cèl·lules beta completin el programa apoptòtic (Figura 11).

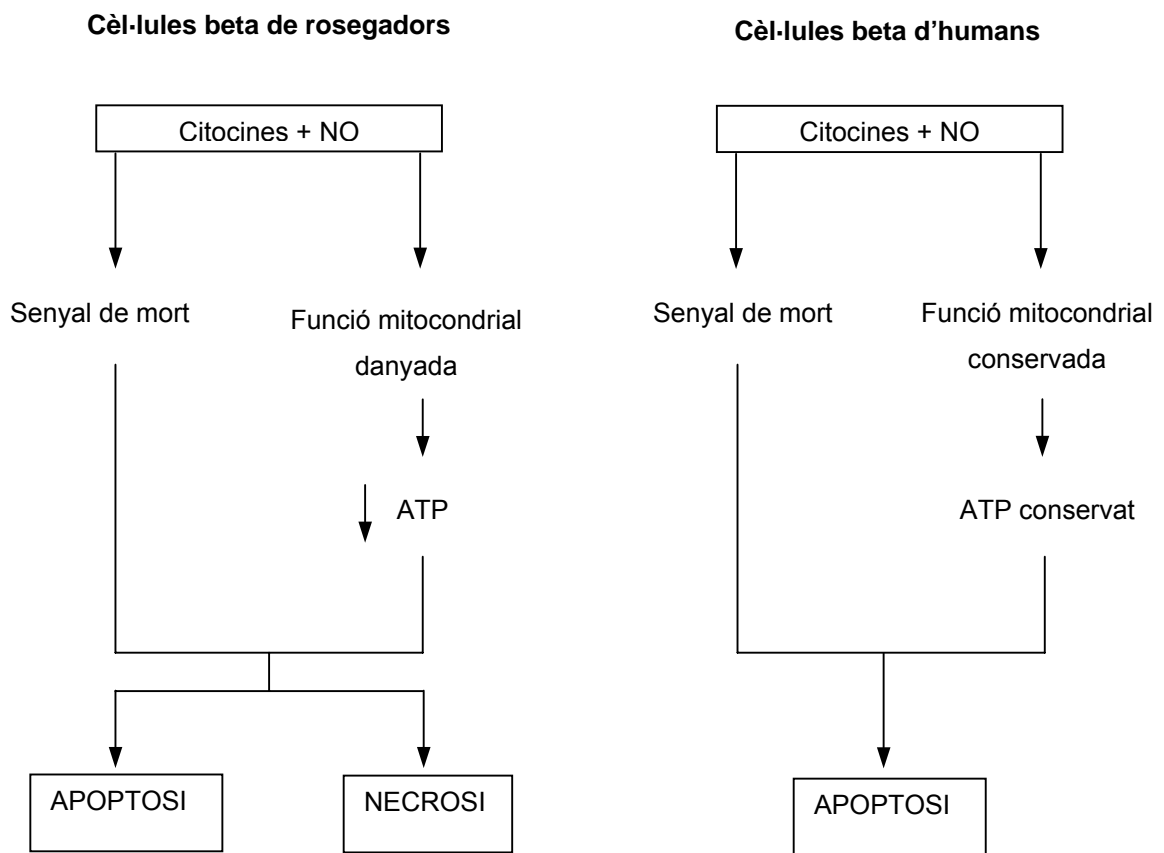


Figura 11. Model proposat de la mort induïda per citocines en els illots de rosegadors o els d'humans. En el cas dels rosegadors l'òxid nítric (NO) causa danys en el mitocondri, afectant la funció mitocondrial i la formació d'ATP. Com a conseqüència, la mort que es produeix en les cèl·lules beta és tant per apoptosi com per necrosi. En canvi, en els illots humans la funció mitocondrial es manté, amb la qual cosa es pot produir l'apoptosi. Així, en els illots humans exposats a citocines el tipus de mort que es produeix és l'apoptosi. Extret de Eizirik DL i Darville MI, 2001.

6. TRASPLANTAMENT D'ILLOTS PANCREÀTICS

Actualment la millor manera d'aconseguir un control estricte dels nivells de glucosa en sang en els pacients diabètics de tipus 1 és amb l'administració diària d'insulina exògena. Amb aquest tractament alguns pacients aconsegueixen endarrerir i en alguns casos fins i tot evitar l'aparició de les complicacions, tot i que aquest estricte control metabòlic acostuma a estar associat amb episodis freqüents d'hipoglucèmia. De totes maneres, aquesta només és una teràpia pal·liativa. Una teràpia curativa de la malaltia seria aquella que retornés al pacient la seva capacitat endògena de produir insulina de manera controlada i així normalitzar el seu control metabòlic. I 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. Les dues maneres en que es pot fer actualment són el trasplantament de pàncrees o el trasplantament d'illots pancreàtics.

6.1. Trasplantament de pàncrees

En les últimes dades aparegudes al Registre de Trasplantaments de Pàncrees Internacional (IPTR, de les sigles en anglès *International Pancreas Transplant Registry*), de finals del 2.004, s'havien registrat més de 20.000 trasplantaments de pàncrees en tot el món (Gaglia JL i col., 2005; Berney T i col., 2005). De tot aquests trasplantaments, el 85% dels pacients havien aconseguit regular la seva glucèmia sense la necessitat d'injeccions d'insulina exògena durant un any com a mínim. Tres anys després del trasplantament el 80% dels pacients encara mantenia la normoglucèmia sense cap requeriment d'insulina exògena (Berney T i col., 2005). En els estudis de casos control es demostra que el trasplantament de pàncrees pot disminuir i, fins i tot, impedir la progressió de les complicacions degudes a la diabetis, com la nefropatia i la neuropatia (Fioretto P i col., 1998; Navarro X i col., 1997). Tot i aquests bons resultats, el trasplantament de pàncrees sencer presenta alguns desavantatges, com són el d'una cirurgia complicada (el trasplantament s'ha de fer amb el pacient ingressat a l'hospital), i, tot i que les taxes de les complicacions degudes al procediment i de mortalitat han disminuït molt, encara continuen sent significatives (Robertson RP i col., 2000). Un altre problema que presenta el trasplantament és la immunosupressió, perquè, a més a més del que pot suposar per al pacient, els tractaments actuals també són tòxics per als illots pancreàtics. Així doncs, la relació riscos/beneficis és més alta que per al tractament amb insulina i això fa que només uns quants pacients amb diabetis mellitus de tipus 1 siguin els candidats per al trasplantament de pàncrees sencer. Normalment ho són els que s'han de sotmetre a un altre trasplantament (habitualment de ronyó) i hauran de prendre igualment el tractament immunosupressor, o bé aquells pacients

que tenen una inestabilitat metabòlica molt greu i la insulina exògena no aconsegueix regular bé els nivells de glucèmia.

6.2. Trasplantament d'illots pancreàtics

El trasplantament d'illots pancreàtics, en canvi, presenta una menor morbiditat/mortalitat que el de pàncrees sencer. És un procediment menys invasiu en el qual els illots s'injecten a la vena porta i impacten en el fetge (Figura 12), i d'aquesta manera s'eviten les complicacions quirúrgiques del trasplantament de pàncrees sencer.

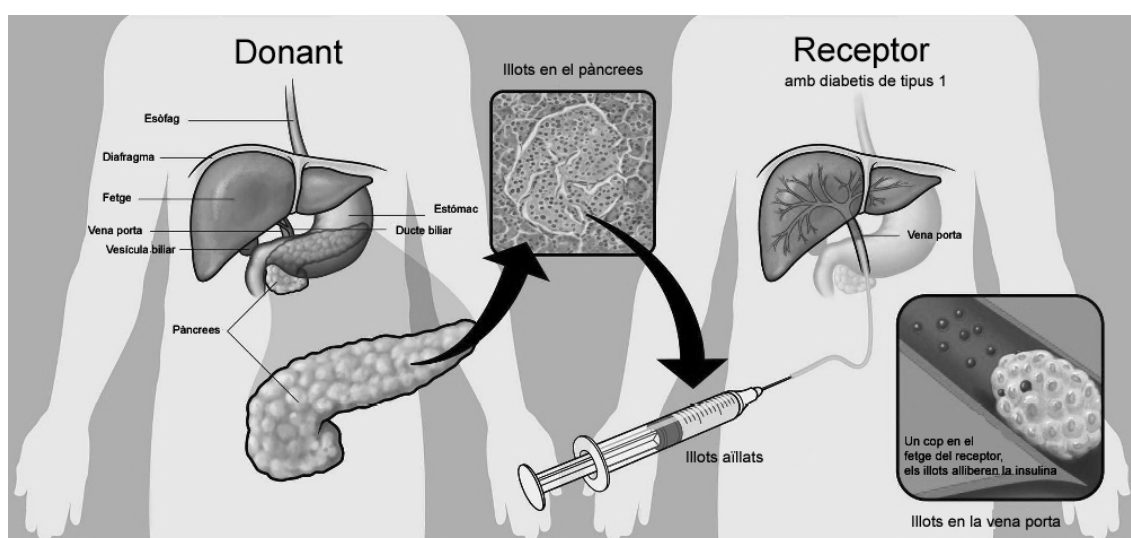


Figura 12. Esquema del trasplantament d'illots pancreàtics. S'extreu el pàncrees del donant i s'aïllen els illots de Langerhans. Quan s'ha obtingut una població pura d'illots s'injecta al receptor a través de la vena porta i els illots arriben al fetge on poden funcionar normalment produint la insulina necessària que el pàncrees malmès del receptor no era capaç de produir. Extret de Naftanel MA i Harlan DM, 2004.

L'objectiu al qual es pretén arribar és evitar la necessitat d'un tractament immunosupressor o bé, perquè els illots s'han encapsulat (permetent l'entrada de nutrients i glucosa i la sortida de la insulina però evitant que siguin reconeguts i destruïts per el sistema immunològic del receptor), o bé perquè s'han modificat les característiques immunogèniques. Evitant el risc de la immunosupressió seria clínicament i èticament acceptable realitzar el trasplantament en fases inicials de la malaltia, quan encara no han aparegut les complicacions (Montanya E, 2001). Fins al moment, però, el trasplantament d'illots pancreàtics només es realitza a aquells pacients que tenen una pobre regulació de la glucèmia, en un intent de millorar el seu control metabòlic.

6.2.1. Història del trasplantament d'illots

A principis dels anys 70 ja es va aconseguir curar la diabetis en animals d'experimentació mitjançant el trasplantament d'illots pancreàtics (Ballinger WF i Lacy PE, 1972). Des d'aquell moment l'esforç per traslladar l'èxit aconseguit en els animals d'experimentació als pacients amb diabetis no es va veure compensat, i durant els anys 70 i 80 es van fer nombrosos intents que van fracassar. No és fins la dècada de 1.990 quan s'aconsegueix que pacients amb diabetis de tipus 1 mantinguin els seus nivells de glucosa en sang dintre del rang normal sense la necessitat de la insulina exògena (Scharp DW i col., 1990; Warnock GL i col., 1992). Tot i això només un 12% dels pacients trasplantats durant aquella dècada van aconseguir la independència de la insulina exògena en algun moment i tan sols el 8% la van poder mantenir durant més d'un any (Brendel M i col., 1999).

La situació va canviar quan en l'any 2.000 James Shapiro i els seus col·laboradors a Edmonton (Canadà) aconsegueixen revertir la diabetis durant un any al 100% (7 de 7) dels pacients que van trasplantar usant un nou protocol conegut com el "protocol d'Edmonton" (Shapiro JAM i col., 2000). Dos anys després, el 80% dels trasplantats seguien sense necessitar el tractament amb la insulina exògena (Ryan EA i col., 2002). L'èxit d'aquests resultats va ser degut, bàsicament, a dos punts: el trasplantament d'un gran nombre d'illots de gran qualitat i un canvi en la pauta immunosupressora. Es va haver de trasplantar un nombre molt superior d'illots al que s'esperaria per poder aconseguir la normoglicèmia, uns 800.000 illots en un, dos o tres trasplantaments. Se sap que el nombre d'illots que és necessari per restablir la normoglicèmia és inferior: dades d'autotrasplantament en pacients que no són diabètics però que han hagut de ser pancreatectomitzats indiquen que amb només 300.000 illots s'aconsegueix la normoglicèmia durant més de dos anys en aproximadament el 75% dels trasplantaments (Gruessner AC i Sutherland DE, 1997). Així doncs, en aquest cas es va augmentar molt el nombre d'illots que es va trasplantar a més de la seva qualitat. Per a l'obtenció dels illots es va evitar l'ús de productes que continguessin xenoproteïnes per reduir la destrucció d'aquests illots immediatament després del trasplantament i també es va minimitzar el temps d'isquèmia freda que van patir els illots abans de ser trasplantats. Es va canviar la pauta immunosupressora i es van evitar els glucocorticoides per tal de minimitzar els danys sobre les cèl·lules beta i la resistència a la insulina que aquests productes provocaven.

Des de l'any 2.000 s'han fet més de 470 trasplantaments d'illots a pacients amb diabetis de tipus 1, en 43 centres diferents de tot el món, i en tots ells s'han aconseguit altes taxes d'independència de la insulina en el primer any (Shapiro AMJ i col., 2005). S'ha realitzat, també, un estudi multicèntric internacional, en el qual han intervingut 9 centres i en el que s'ha usat el protocol del grup d'Edmonton per l'aïllament i trasplantament d'illots. Amb aquest assaig

s'ha comprovat que el protocol es reproduïble i en els 3 centres amb més experiència s'ha aconseguit que el 80% dels pacients trasplantats aconseguissin la independència de la insulina exògena. En els altres centres amb menys experiència l'èxit ha sigut més variable (0%–63%) (Shapiro AMJ i col., 2003). Aquests resultats mostren que el protocol pot ser reproduït a diferents centres, però també que hi ha una gran diferència en el resultat del trasplantament depenent de l'experiència del grup en l'obtenció i trasplantament dels illots.

L'any 2.005 va aparèixer un nou treball del grup d'Edmonton on es feia el seguiment dels trasplantaments fets per aquest mateix grup (Ryan EA i col., 2005). Fins l'1 de novembre de 2.004, seixanta-cinc pacients havien estat trasplantats. Cinc dels pacients van tenir prou amb un sol trasplantament per aconseguir la independència de la insulina exògena. Dels 52 que van ser trasplantats per segona vegada, 33 van aconseguir la independència de la insulina i 6 pacients van necessitar un tercer trasplantament per no necessitar la insulina. La mitjana d'illots que es va haver de trasplantar a un pacient per a que aconseguís la normoglucèmia era d'uns 800.000 illots, tot i que el nombre d'illots requerits resultava molt variable (Figura 13). El 94% dels trasplantaments va aconseguir la independència de la insulina i es va mantenir durant uns 15 mesos de mitjana. Només 3 pacients no van aconseguir la insulinoindependència després d'un tercer trasplantament.

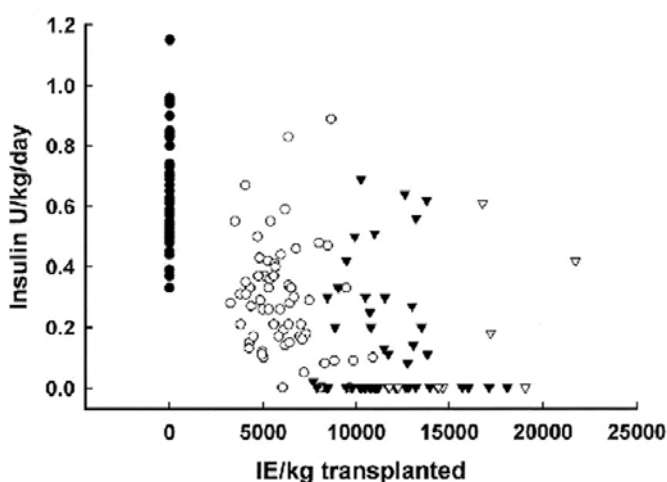


Figura 13. Requeriment d'insulina exògena en funció del nombre d'illots trasplantats en l'estudi de Ryan i col·laboradors. Després d'un primer trasplantament d'aproximadament 6.000 IE/kg (cercles blancs), després d'un segon trasplantament (triangles negres) i després d'un tercer (triangles blancs). El requeriment d'insulina disminueix després del primer trasplantament, i la majoria dels receptors passen a ser independents de la insulina exògena després del segon. Pocs pacients necessiten un tercer trasplantament, però tres d'ells segueixen necessitant la insulina exògena tot i haver estat trasplantats per tercera vegada. Extret de Ryan EA i col., 2005.

Després de cinc anys només un 10% dels receptors del trasplantament no requereix les injeccions d'insulina exògena, tot i que en el 80% dels pacients trasplantats se segueix detectant pèptid C (pèptid resultant de la maduració de la proinsulina i que, en aquest cas, s'usa com a indicador de la supervivència de l'empelt). Així doncs, encara que la presència de pèptid C indiqui la producció d'insulina per les cèl·lules beta de l'empelt, la major part de trasplantaments no són suficientment funcionals i cal administrar la insulina exògena. Aquesta divergència indica que no es produeixen els nivells necessaris d'insulina, i aquest fet pot ser degut a que la massa de cèl·lules beta supervivent no sigui la suficient i/o que la funció d'aquestes cèl·lules beta estigui deteriorada (Ryan EA i col., 2005). En els estudis de seguiment es mostra que la capacitat funcional dels illots trasplantats és d'entre un 20% i un 40% de la que tindria una persona que no fos diabètica (Ryan EA i col., 2002). Els estudis suggereixen que només una part dels illots trasplantats s'implanten amb èxit i sobreviuen. De fet, en el trasplantament en animals d'experimentació s'ha demostrat que es produeix una pèrdua d'aproximadament el 60% de la massa beta en el trasplantament singènic (Biarnés M i col., 2002). La reducció de la massa de l'empelt té diferents causes possibles: el rebuig agut, el rebuig crònic, la toxicitat que diferents fàrmacs tenen sobre els illots, la recurrència de l'autoimmunitat i/o la fallida en la regeneració de les cèl·lules dels illots en el temps com a resultat de l'efecte del sirolimus (un dels fàrmacs usat en la immunosupressió que té propietat antiproliferatives) (Shapiro AMJ i col., 2005).

Tot i els bons resultats inicials, els resultats que es tenen en el seguiment a més llarg termini dels trasplantaments ens indiquen que encara cal seguir millorant les tècniques d'obtenció dels illots, el manteniment de la funció així com de la massa de les cèl·lules beta trasplantades i que cal millorar la pauta immunosupressora, responsable de moltes de les complicacions secundàries (ulceracions bucals, edemes, quists ovàrics, augment de la proteinúria, hipertensió i hipercolesterolèmia) que tenen els receptors del trasplantament (Ryan EA i col., 2005).

6.2.2. Massa cel·lular beta i trasplantament d'illots

Una de les principals limitacions amb què es troba el trasplantament d'illots pancreàtics és la falta d'òrgans donants. Hi ha una gran desproporció entre el nombre de donants i de possibles receptors del trasplantament. A Espanya, per exemple, un dels països del món amb una taxa de donants d'òrgans més alta, hi ha aproximadament uns 1.500 donants per any (dades de l'any 2.005, de la Organització Nacional de Trasplantes). Tot i usant tots aquests pàncrees per al trasplantament d'illots no serien suficients per a trasplantar els 100.000 pacients de diabetis mellitus de tipus 1 que existeixen, ni tan sols serien suficients per a trasplantar els 2.000 nous

pacients que es diagnostiquen cada any. Si a més es té en compte que es necessita més d'un pàncrees per a trasplantar un únic pacient amb èxit aquesta desproporció encara es fa més gran.

Un altre dels problemes del trasplantament d'illots és la pèrdua de teixit que es produeix durant l'obtenció i el trasplantament dels illots, fent que sigui necessari un major nombre d'illots del que s'esperaria per a aconseguir la normoglucèmia. Aquests fets es detallen a continuació, però cal tenir en compte que tot i que el procés d'obtenció dels illots ha millorat molt en els últims anys, la qualitat dels illots obtinguts encara no és l'òptima. Si, a més a més, s'afegeix el fet que després del trasplantament es poden donar processos de rebuig, la recurrència de l'autoimmunitat i processos d'inflamació inespecífica, que fan que hi hagi una pèrdua important del teixit trasplantat, el número d'illots que cal trasplantar és una massa més gran que la que es podria preveure (Weir GC i col., 1990; Kaufman DB i col., 1990(a); Warnock GL i col., 1988; Warnock GL i col., 1990). Això, juntament amb la limitació en el nombre de donants i la necessitat de 2–3 donants per a curar un receptor, fan que hi hagi la necessitat de desenvolupar noves vies d'obtenció de les cèl·lules beta per al trasplantament.

Una de les fonts alternatives per a suplir la poca disponibilitat d'òrgans per al trasplantament d'illots és utilitzar els illots d'una altra espècie (xenotrasplantament). L'espècie més usada per als estudis i com a possible donant d'illots és la porcina. Els illots porcins presenten bastants avantatges enfront d'altres espècies: es produeixen en grans quantitats per el consum humà, la insulina porcina s'ha estat utilitzant com a font d'insulina exògena durant molts anys i els porcs responen als nivells de glucosa en sang dins dels mateixos límits i als mateixos estímuls que els humans (MacKenzie DA i col., 2003). A més, també s'ha comprovat que els illots porcins obtinguts tant de porcs adults, fetals o nounats tenen la capacitat de restablir l'euglucèmia en models animals experimentals de diabetis (Thompson SC i Mandel TE, 1990; Davalli AM i col., 1995; Weir GC i col., 1997; Vizzardelli C i col., 2002). Presenten, però, alguns desavantatges que fan que no s'apliquin com a tractament, com són el rebuig i el risc de zoonosi o la transmissió d'agents infecciosos entre espècies. En aquest cas, també cal tenir en compte que la zoonosi es pot estendre a tota l'espècie humana, que l'hoste està immunodeprimit, augmentant-ne el risc de la infecció i que si els illots estan encapsulats encara es protegeix millor l'agent infecciosos. Cal resoldre tots aquests problemes abans d'usar els illots porcins com a possible font alternativa de cèl·lules beta per al trasplantament.

Unes altres fonts alternatives de teixit beta per al trasplantament són les cèl·lules beta. Per a aconseguir un cultiu de cèl·lules beta es pot o bé expandir les cèl·lules beta diferenciades o bé diferenciar-les a partir de cèl·lules progenitores. Com que les cèl·lules beta madures tenen una taxa de proliferació limitada el que es fa és generar línies de cèl·lules beta que expressin un

oncogen. Amb això s'aconsegueix forçar la replicació d'aquestes cèl·lules però, per contra, aquestes cèl·lules es desdiferencien i queda minvada la seva capacitat de produir i secretar insulina. A més, aquestes cèl·lules que repliquen sense control no són adients per a trasplantar perquè poden acabar produint tumors en el receptor (Efrat S, 2002).

L'alternativa a forçar la replicació de les cèl·lules beta madures és induir la diferenciació a partir de cèl·lules progenitores (cèl·lules mare), que tenen una gran capacitat proliferativa, cap a cèl·lules productores d'insulina. Aquestes cèl·lules es poden mantenir en cultiu en condicions que mantinguin la seva pluripotencialitat i després induir la seva diferenciació cap a cèl·lules productores d'insulina. S'ha pogut comprovar que aquestes cèl·lules procedents de cèl·lules mare embrionàries poden restablir l'euglucèmia en ratolins diabètics per estreptozotocina (Soria B i col., 2000). Les cèl·lules beta obtingudes per diferenciació a partir de les cèl·lules mare embrionàries s'allunyen en alguns aspectes del fenotip de les cèl·lules beta adultes. Algunes d'aquestes desviacions, però, poden representar un avantatge. Per exemple, aquestes cèl·lules no expressen els antígens de les cèl·lules beta que són el blanc del sistema immunològic i, per tant, són resistents a la recurrència de l'autoimmunitat. També expressen un alts nivells d'enzims protectors, com són la catalasa i la superòxid dismutasa, sent més resistents als radicals d'oxigen que les cèl·lules beta "normals". Amb aquesta tècnica desenvolupada, es podrien produir cèl·lules productores d'insulina autòlogues per transferència de nuclis de cèl·lules procedents del pacient diabètic a oòcits i les cèl·lules mare autòlogues resultants evitarien el rebuig de l'empelt i la recurrència a l'autoimmunitat (Efrat S, 2002).

Les cèl·lules mare progenitores d'un determinat teixit tenen la capacitat de transdiferenciar-se en un altre tipus cel·lular aplicant l'estímul adequat. Aquest tipus de cèl·lules mare es troben en molts teixits adults i són les responsables de la renovació del teixit que es produeix per a mantenir el teixit durant tota la vida de l'organisme. La capacitat de proliferació d'aquest tipus de cèl·lules mare és inferior al de les cèl·lules mare embrionàries, però es pot manipular genèticament aquesta capacitat, per exemple, fent expressar el gen de la telomerasa. De totes maneres, aquesta limitació de la proliferació és suficient per al seu ús com a cèl·lules autòlogues i a més, representa un avantatge perquè es redueix el risc de generar tumors. En cultiu s'ha aconseguit obtenir cèl·lules productores d'insulina a partir de cèl·lules ductals humanes (Bonner-Weir S i col., 2000) i de ratolí (Ramiya VK i col., 2000). Tot i que aquests resultats són encoratjadors, l'eficiència de l'expansió del teixit ductal en cultiu i la taxa de diferenciació cap a cèl·lules productores d'insulina encara són massa baixes com per obtenir suficients cèl·lules per al trasplantament.

6.2.3. Pèrdua de teixit beta en el trasplantament d'illots

6.2.3.1. Pèrdua de teixit beta durant l'obtenció dels illots

Amb l'ús d'un mètode semiautomàtic d'aïllament dels illots (mètode de Ricordi, Ricordi C i col., 1988) i amb el canvi de l'enzim col·lagenasa per la liberasa s'ha aconseguit millorar el rendiment i la reproductibilitat de l'aïllament, però tot i així la qualitat dels illots obtinguts encara no és òptima.

Un dels factors que influeix en que no s'aconsegueixi una qualitat òptima dels illots, és l'ús durant l'aïllament de reactius que contenen una alta activitat endotoxina. Bàsicament els reactius que tenen una més alta activitat endotoxina són la col·lagenasa, que és una barreja d'enzims proteolítics obtinguts de *Clostridium histolyticum* i que s'utilitza per digerir el pàncrees, i els gradients de densitat utilitzats per purificar els illots (Vargas F i col., 1998). Tant els illots humans com els de rata expressen CD14, el receptor de lipopolisacàrid (LPS) i d'endotoxines bacterianes (Vives-Pi M i col., 2003). Les cèl·lules que presenten CD14 són les cèl·lules beta i les alfa dels illots, les cèl·lules dels ductes pancreàtics i els macròfags. En els macròfags i en els illots humans l'endotoxina induïx la producció de citocines inflamatòries, com són la IL-1 α , IL-1 β , TNF- α i IL-6 (Vargas F i col., 1998) i en els illots de ratolí també s'ha detectat la producció de IL-1 β , TNF- α i IL-6 en illots aïllats amb col·lagenasa (Berney T i col., 2001).

Amb l'ús d'aquests productes que contenen endotoxina es produeixen dos mecanismes que actuen de manera sinèrgica i que poden participar en la fallida de l'empelt:

(a) L'endotoxina estimula la producció de citocines proinflamatòries en els macròfags i les cèl·lules endotelials de l'hoste fent augmentar la migració de monòcits, cèl·lules polimorfonuclears i limfòcits cap a l'empelt, augmentant la resposta inflamatòria local i afavorint que es produeixi el rebuig posterior.

(b) Durant el cultiu previ al trasplantament el teixit insular també ha estat exposat a l'endotoxina i haurà produït citocines proinflamatòries, augmentant els nivells de molècules d'adhesió en el moment que sigui trasplantat. A més les citocines produïdes en el teixit trasplantat també poden actuar sobre els macròfags de l'hoste, contribuint encara més a augmentar la resposta inflamatòria local.

Durant l'aïllament i purificació dels illots també es produeix la pèrdua de factors de supervivència, com són els factors de creixement presents en el pàncrees i els factors tròfics

presentes en la matriu extracel·lular. També es perd la interacció cèl·lula-cèl·lula i les connexions del citoesquelet amb la matriu extracel·lular. Evitant la pèrdua d'aquests factors es millora la supervivència dels illots en cultiu. Per exemple, s'ha comprovat que quan els illots es mantenen en cultiu amb cèl·lules de l'epiteli ductal o amb els productes que secreten les cèl·lules dels ductes, la necrosi central i l'apoptosi dels illots disminueix significativament (Ileva A i col., 1999).

El citoesquelet estructura i manté la cèl·lula i, a més, el citoesquelet té connexions a través de les integrines transmembrana amb la matriu extracel·lular, formant una xarxa que té propietats estructurals i funcionals. Les integrines tenen la funció de transmetre diferents senyals a la cèl·lula, entre ells el de mort quan es produeix la disrupció de les connexions entre el citoesquelet i la matriu extracel·lular. A aquest tipus d'apoptosi mediada per les integrines se l'anomena **anoikis**. Aquest tipus de mort es produeix quan els illots es mantenen en cultiu i pot ser evitat si la digestió dels illots és incompleta i es manté la matriu extracel·lular (Thomas FT i col., 1999).

6.2.3.2. Pèrdua de teixit beta després del trasplantament

La fallida de l'empelt es pot produir per la pèrdua de funció de les cèl·lules beta, així com per la mort de les cèl·lules beta trasplantades. Després del trasplantament es produeixen diferents fenòmens que fan que es perdi massa insular trasplantada i que l'empelt acabi fracassant. Aquests fenòmens poden ser:

(a) **Rebuig de l'empelt.** La fallida de l'empelt al·logènic, en part, és deguda a la destrucció de les cèl·lules dels illots trasplantats per part del sistema immunològic (Scharp DW i col., 1991; Ricordi C i col., 1992). Les cèl·lules presentadores d'antígens (APCs) de l'hoste processen els antígens que presenten les noves cèl·lules de l'empelt i els presenten a les cèl·lules T CD4⁺. A més a més, si la injecció dels illots és intraportal, com en el cas del trasplantament d'illots en humans, la presència de macròfags en aquesta zona condueix a l'alliberament de citocines que contribueixen al procés de rebuig. En l'empelt al·logènic se secreten diferents citocines inflamatòries, com són la IL-1 α , IL-2, IL-6 i IFN- γ (Ozasa T i col., 1997) que intervenen en la destrucció dels illots.

(b) **Reparició de l'autoimmunitat.** En la diabetis mellitus de tipus 1 la destrucció de les cèl·lules beta és la conseqüència d'una reacció autoimmunològica contra les cèl·lules beta del pàncrees. Que el trasplantament d'illots es faci en un pacient amb una base autoimmune pot contribuir a la pèrdua de l'empelt (Bosi E i col., 2001). Aquesta contribució es mostra en

(i) diferents estudis en els quals s'observa la infiltració dels illots acompanyada d'una resposta inflamatòria i la destrucció selectiva de les cèl·lules beta en trasplantaments, tant d'òrgan sòlid com d'illots (Tyden G i col., 1996; Stegall MD i col., 1996), (ii) un menor èxit dels trasplantaments d'illots fets en models animals de diabetis autoimmune que en models d'animals diabètics en els quals la diabetis no té un origen autoimmune (Prowse SJ i col., 1986; Markees TG i col., 1999), (iii) una taxa d'èxit del trasplantament inferior en pacients amb diabetis mellitus de tipus 1 que en pacients que han de ser trasplantats amb illots per d'altres causes, com, per exemple, perquè han de ser sotmesos a una pancreatectomia (Tzakis AG i col., 1990; Ricordi C i col., 1997), (iv) l'associació que es troba entre la fallida de l'empelt i la presència d'anticossos anti-illot abans del trasplantament (Jaeger C i col., 1997) i (v) l'augment en la quantitat d'auto-anticossos i l'activació de les cèl·lules T que es produeixen després del trasplantament i que es corresponen amb la posterior fallida de l'empelt (Roep BO i col., 1999). A més, aquesta fallida es pot evitar si se suprimeix l'activació de les cèl·lules T en els receptors d'un trasplantament d'illots amb diabetis d'origen autoimmune (Carter JD i col., 2005).

(c) **Pèrdua de la funció primària de l'empelt** (PNF de l'anglès *Primary non-function*). S'utilitza en el context en què l'empelt fracassa ràpidament i no arriba a ser funcional. Aquest fet està descrit per als empelts al·logènics, però també té lloc quan els trasplantaments són singènics (Nagata M i col., 1990) o en models en els quals les cèl·lules T es troben inactives (Chahine AA i col., 1995; Kaufman DB i col., 1990(b)), suggerint que no només el rebuig i l'autoimmunitat poden estar contribuint en aquest fenomen de pèrdua de funcionalitat i fracàs de l'empelt inicials.

Són diferents els mecanismes inespecífics que poden intervenir en la pèrdua inicial de l'empelt, a més dels processos que es produeixen durant l'obtenció dels illots i que poden determinar la supervivència dels illots trasplantats. Per exemple, la manca de vascularització de l'empelt en un inici o l'exposició a un microambient desfavorable en el lloc d'implantació de l'empelt que provoca una resposta inflamatòria inespecífica (Berney T i col., 2001) són dos fenòmens que contribueixen a la PNF. Les cèl·lules de l'illot requereixen més d'un 10% del flux sanguini del pàncrees (Lifson N i col., 1980). Després de l'aïllament el flux sanguini dels illots queda interromput i tot i que hagin quedat algunes cèl·lules de l'endoteli vascular, aquestes no sobreviuran més de 2–3 dies (Parr EL i col., 1980). Això fa que els illots depenguin de la difusió de nutrients i d'oxigen des de la perifèria fins que el procés de revascularització no es completa, cap allà el dia deu després del trasplantament (Menger MD i col., 2001). Durant el període posterior al trasplantament les cèl·lules de l'illot són molt vulnerables i a més estan exposades a hipòxia, que també pot contribuir a la mort de les cèl·lules de l'empelt (Davalli AM i col., 1996). Els empelts inicialment també poden presentar cèl·lules mortes procedents del procés d'aïllament que, juntament amb les que moren per manca de vascularització, o per d'altres

causes, poden estar amplificant el procés inflamatori, el qual pot provocar nous problemes funcionals i la destrucció de les cèl·lules de l'empelt. En diferents estudis s'ha suggerit el paper dels macròfags en aquesta pèrdua de funció i de teixit inicial, quan s'observa que el tractament amb diferents agents que inactiven els macròfags o els eliminen milloren la supervivència de l'empelt en models de trasplantament (Bottino R i col., 1998; Kaufman DB i col., 1994; Stephanian E i col., 1992).

A més d'aquests fenòmens que afavoreixen la pèrdua i disfunció del teixit trasplantat, l'estat metabòlic del receptor influeix en l'evolució de l'empelt. En estudis fets amb animals diabètics que han estat trasplantats amb una massa insuficient per a restablir la normoglicèmia es pot observar que la massa beta trasplantada disminueix progressivament (Montaña E i col., 1993). En canvi, si els animals diabètics són tractats amb insulina des d'uns dies abans fins un temps després del trasplantament, s'aconsegueix que la massa beta trasplantada dos mesos després sigui similar a la que s'havia trasplantat inicialment (Merino JF i col., 1997). La normoglicèmia del receptor també ajuda a mantenir millor la funció de les cèl·lules beta trasplantades (Davalli AM i col., 1996), amb la qual cosa s'aconsegueix que un cop eliminat el tractament amb la insulina, sigui l'empelt qui mantingui la normoglicèmia tot i que sigui s'hagi trasplantat una massa insuficient (Merino JF i col., 1997 i 2000).

El nostre grup ha estudiat els efectes de la hiperglicèmia sobre la mort i la massa de les cèl·lules beta en el trasplantament d'illots singènics. Després del trasplantament es produeix una pèrdua d'aproximadament el 60% de la massa beta trasplantada, malgrat l'absència de rebuig o autoimmunitat. Aquesta pèrdua és deguda a un augment de l'apoptosi i de la necrosi, independentment de les condicions metabòliques del receptor (Biarnés M i col., 2002).

En base a aquests estudis vam decidir d'estudiar més a fons els mecanismes que es produïen en l'empelt durant els primers dies després del trasplantament. Més concretament, la producció de citocines, i si l'estat metabòlic del receptor intervenia modulant-ne aquesta producció. D'altra banda, i tenint en compte, que gran part de la massa de l'empelt es perd ja durant els primers dies, vam voler estudiar si es produïa un efecte beneficiós per a l'evolució de l'empelt en disminuir l'apoptosi durant aquests primers dies.