

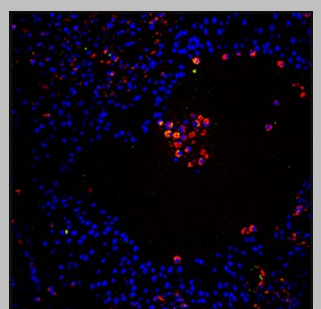
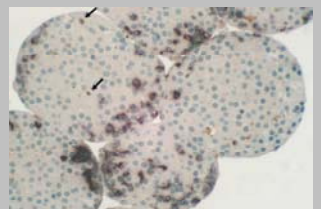
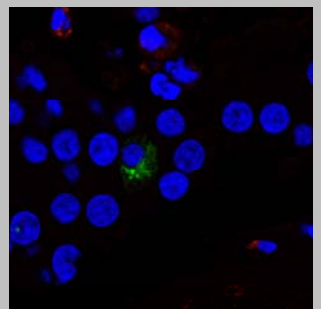
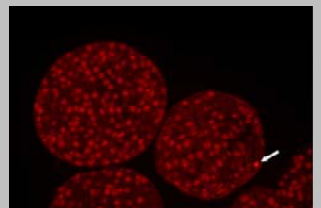
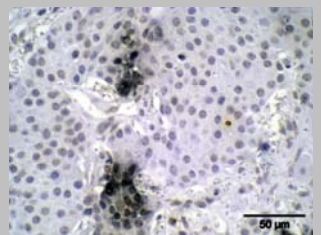
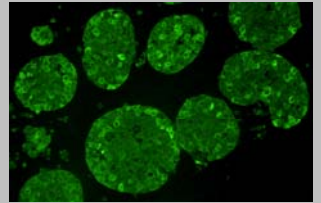
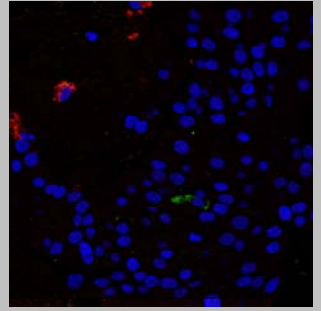
UNIVERSITAT DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES CLÍNiques

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

Marta Montolio Rusiñol

2006



MATERIAL I MÈTODES

7. DISSENY EXPERIMENTAL

Objectius 1 i 2. Caracterització del patró d'expressió de citocines en els empelts d'illots singènics i la seva modulació per l'estat metabòlic del receptor.

Per estudiar la presència de citocines inflamatòries en l'empelt d'illots durant els primers dies després del trasplantament es van trasplantar rates Lewis amb 500 illots singènics. Aquest nombre d'illots és una massa beta insuficient per a restablir la normoglicèmia dels receptors diabètics (Bell RC, 1994; Tobin BW, 1993). Per poder estudiar l'efecte que la glucèmia pogués tenir sobre l'expressió de les diferents citocines es van usar dos grups d'animals receptors, un de normoglicèmic (animals control) i un altre d'hiperglicèmic (animals injectats amb estreptozotocina, STZ). Els empelts es van extreure el dia 1, el dia 3 i el dia 7 després del trasplantament. En aquests mateixos dies es va fer el seguiment dels nivells de glucosa en sang i el pes de l'animal. Com a mostres basals amb les quals comparar l'expressió de les diferents citocines es van usar sis grups d'illots frescos de rata Lewis i sis grups d'illots cultivats durant 24 h. Tant d'aquestes mostres com dels empelts es va fer l'extracció de l'RNA total, la síntesi del DNA complementari (cDNA) i es va determinar l'expressió de les diferents citocines (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 i IL-4) usant la tècnica de la PCR quantitativa a temps real.

També es va estudiar la presència de les proteïna de IL-1 β i d'iNOS en empelts d'illots de rates Lewis. En aquests cas, després de l'extracció empelts es van processar per a realitzar la immunohistoquímica. Per identificar el tipus cel·lular productor de la IL-1 β i/o iNOS els empelts es van tenyir també amb un marcador de cèl·lules de la línia de macròfags (CD68).

Objectiu 3. Efecte de la inhibició de l'apoptosi

Per realitzar els estudis d'inhibició de l'apoptosi es van usar ratolins C57BL/6 singènics ja que era un model de trasplantament ben conegut en el nostre grup en el qual s'havia fet un ampli estudi sobre la mort de les cèl·lules beta trasplantades (Biarnés M i col., 2002). Per reduir l'apoptosi de les cèl·lules beta es va usar l'inhibidor de les caspases z-VAD.fmk. L'estudi es va dividir en tres parts:

1. Estudi *in vitro*. Per estudiar l'eficàcia de l'inhibidor de les caspases sobre la mort per apoptosi induïda per citocines es va usar una barreja de citocines (IL-1 β + TNF- α + IFN- γ) per induir la mort dels illots en cultiu ja que és ben conegut els efectes que tenen sobre la supervivència de les cèl·lules beta (Liu D, 2000; Hoorens A, 2001). Abans de fer el cultiu amb

les citocines els illots es van incubar amb l'inhibidor d'ampli espectre de les caspases, z-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona (z-VAD.fmk) durant un curt temps (2 h). En aquests estudis es va estudiar tant l'efecte del z-VAD.fmk sobre l'apoptosi com sobre el contingut d'insulina i DNA dels illots.

2. Estudi dosi-efecte. Per determinar quina era la concentració adequada de z-VAD.fmk que reduïa l'apoptosi en els illots trasplantats es van trasplantar ratolins C57BL/6 amb 150 illots singènics. En el model de ratolí aquest nombre d'illots és una massa insuficient per a restablir la normoglicèmia (Montaña E, 1993). Abans de trasplantar-los, els illots es van preincubar amb diferents concentracions de z-VAD.fmk (100 μ M, 200 μ M o 500 μ M). Els empelts es van extreure el dia 3 després del trasplantament ja que en estudis anteriors del grup s'havia pogut determinar un augment important de l'apoptosi en aquest moment (Biarnés M i col., 2002). En aquests empelts es va determinar l'apoptosi i la necrosi.

3. Estudi de la inhibició de l'apoptosi en el trasplantament d'illots. Per poder estudiar l'efecte que tenia la reducció o inhibició de l'apoptosi inicial sobre l'evolució metabòlica en els animals diabètics trasplantats es van trasplantar 150 illots tractats amb les dues concentracions de z-VAD.fmk (200 μ M o 500 μ M) que havien demostrat que reduïen l'apoptosi en els illots trasplantats en l'experiment anterior. Quatre setmanes després del trasplantament es van extreure els empelts i es va determinar l'apoptosi i la massa beta trasplantada. Es va fer el seguiment de la glucèmia i el pes dels animals trasplantats el dia 3, el 7 i després setmanalment.

8. ANIMALS D'EXPERIMENTACIÓ

Per l'estudi de l'expressió de citocines en els empelts dels primers dies després del trasplantament es van usar rates Lewis mascles d'entre 7 i 10 setmanes (Harlan Netherlands, Horst, Països Baixos) i per l'estudi de la protecció de les cèl·lules beta trasplantades, ratolins C57BL/6 mascles d'entre 8 i 12 setmanes (Harlan France SARL, Gannat, France). Els animals es van mantenir durant tot l'estudi sota les condicions normals d'estabulació en cambres climatitzades amb accés lliure a l'aigua i al menjar.

Es va usar un model singènic de trasplantament per evitar el rebuig de l'empelt i poder estudiar els efectes del trasplantament sobre els illots. En tots els casos es va trasplantar una massa beta insuficient per a restablir la normoglicèmia en els receptors diabètics; així doncs, els animals diabètics es mantindrien hiperglicèmics durant tot l'estudi i els illots trasplantats estarien sotmesos als efectes de la hiperglicèmia.

9. INDUCCIÓ DE LA DIABETIS

L'estreptozotocina (STZ) és un anàleg de la glucosa que produeix una acció citotòxica sobre les cèl·lules beta de l'illot de manera específica (Figura 14). L'STZ entra en les cèl·lules beta a través del transportador de glucosa Glut 2 (Schnedl WJ, 1994), la seva degradació intracel·lular produeix l'alquilació del DNA i la generació d'òxid nítric (NO), que acaben produint talls per tot el DNA. Això fa que s'activi l'enzim reparador del DNA (poli (ADP-ribose) polimerasa, PARP) que utilitza el NAD^+ com a substrat. L'enzim PARP és molt abundant en la cèl·lula i l'activació sostinguda d'aquest enzim produeix una acusada depleció del NAD^+ . Com a conseqüència, les reserves de ATP de la cèl·lula disminueixen dràsticament en un intent de suplir el NAD^+ necessari, la qual cosa acaba destruint la cèl·lula beta (Yamamoto H, 1981; Charron MJ 1999). S'usa STZ per reproduir la diabetis de tipus 1 en models animals ja que destrueix les cèl·lules beta del pàncrees i produeix la hiperglucèmia.

Els animals receptors del trasplantament es van fer diabètics amb una única injecció intraperitoneal amb STZ (Sigma, St. Louis, MO, USA). La dosi d'STZ dissolta en tampó citrat (11 mM àcid cítric en salí, pH = 4.5) que es va usar va ser de 65 mg/kg pes en el cas de les rates Lewis i de 180 mg/kg pes per als ratolins C57BL/6. La diabetis es va confirmar abans de fer el trasplantament per la presència d'hiperglucèmia (nivells de glucosa en sang superiors a 20 mmol/l en, com a mínim, dues mesures consecutives), per la pèrdua de pes i per la poliúria. El trasplantament va tenir lloc entre els dies 7 i 14 després de la injecció amb STZ.

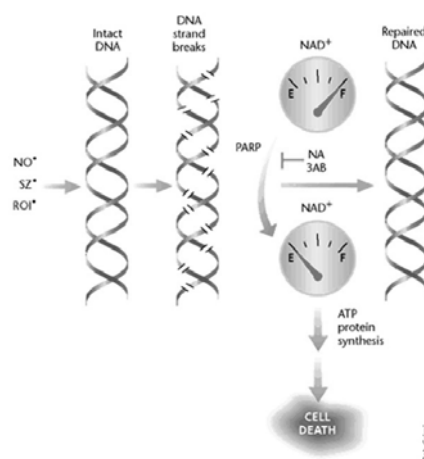


Figura 14. Acció de l'estreptozotocina sobre les cèl·lules beta de l'illot. L'STZ entra a les cèl·lules beta a través del transportador de glucosa Glut 2, aquesta entrada fa que s'augmenti la producció de NO i de molècules reactives d'oxigen (ROS) que indueixen talls en la doble cadena del DNA i s'activa l'enzim reparador de DNA (PARP). Aquest enzim utilitza NAD^+ , que s'esgota i es produeix una disminució de la producció de ATP i de la síntesi proteica, conduint finalment a la mort de la cèl·lula. Extret de Charron MJ, 1999.

10. MESURA DEL PES I LA GLUCÈMIA DELS ANIMALS

Les mesures de pes i glucèmia dels animals es van fer entre les 9 i les 11 h del matí sense que l'animal estigués en dejú. Es va obtenir la sang de la cua dels animals i la glucèmia es va mesurar amb un mesurador de glucosa portàtil (Glucocard Memory, A. Menarini Diagnostics, Barcelona, Espanya). Les mesures abans del trasplantament es van fer el dia de la injecció amb STZ, i als 3, 5 i 7 dies de la injecció. També es van mesurar el dia del trasplantament i posteriorment segons s'indica en els diferents estudis.

11. AÏLLAMENT DELS ILLOTS PANCREÀTICS

Es van anestesiar els animals amb una injecció intraperitoneal de 30 mg/kg pes de pentotal sòdic (Abbott Laboratories, Madrid, Espanya) i se'ls va realitzar una laparotomia mitja. Amb el pàncrees exposat es va lligar el ducte pancreàtic a nivell de l'ampul·la de Vater i es va canular distalment amb un tub de plàstic flexible en el cas de les rates i amb una agulla de 30_{1/2} G en els cas dels ratolins. Es van injectar 7 ml per a les rates i 2 ml per als ratolins, d'una solució de col·lagenasa P (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanya) a una concentració de 2 mg col·lagenasa P/ml medi M-199 (Sigma). Per evitar les diferències en l'activitat de l'enzim i en la quantitat d'endotoxina present en la col·lagenasa que pot alterar l'expressió de citocines en els illots (Vargas F, 1998), es va utilitzar el mateix lot de col·lagenasa P per un mateix estudi. Es va extreure el pàncrees i es va digerir a 37°C durant 23 min per a les rates i 7 min per als ratolins. La digestió es va aturar usant medi M-199 en fred i es van fer tres rentats amb aquest mateix medi. Després d'aquests rentats el digerit es va filtrar amb un filtre de porus de 400 µm de diàmetre per eliminar les restes del teixit no digerit. Els illots es van purificar en un gradient de densitat (Histopaque 1077, Sigma) amb una centrifugació a 2.300 rpm durant 15 min a 4°C. Els illots es van recuperar de la interfase i es van fer tres rentats amb medi M-199 suplementat amb un 10% sèrum de vedella fetal (*Fetal Calf Serum*, FCS; Biological Industries, Beit Haemek, Israel).

Per tal d'obtenir-ne una població pura, els illots es van recuperar manualment amb una pipeta sota un esteromicroscopi dues o tres vegades. Només es van incloure en els estudis els illots d'un diàmetre d'entre 75–250 µm.

12. CULTIU D'ILLOTS

Els illots es van cultivar en un medi estàndard: RPMI-1640 (Sigma), suplementat amb 10% FCS a una concentració de 11.1 mM de glucosa, en una atmosfera humidificada a 37°C i l'aport constant de 5% de CO₂ en l'incubador.

13. INCUBACIÓ DELS ILLOTS AMB L'INHIBIDOR DE LES CASPASES (z-VAD.fmk)

Després de l'aïllament els illots de ratolí es van distribuir en grups de 150 illots i es van mantenir a l'incubador durant 2 h. La incubació es va fer en el medi estàndard al qual se li va afegir l'inhibidor de les caspases, z-VAD.fmk (Bachem, Bubendorf, Suïssa), a una concentració final de 100 µM, 200 µM o 500 µM. L'inhibidor de les caspases z-VAD.fmk es va dissoldre en dimetilsulfòxid (DMSO, Sigma). Per a totes les condicions experimentals, incloent-hi el grup control, la concentració final al medi de DMSO va ser de 0.05%.

14. CULTIU DELS ILLOTS AMB UNA BARREJA DE CITOCINES

Es van cultivar grups de 100 illots de ratolí C57BL/6 durant 48 h en el medi estàndard per al cultiu d'illots. Passat aquest temps els illots es van incubar durant 2 h amb l'inhibidor de les caspases z-VAD.fmk (Bachem, Bubendorf, Suïssa) a una concentració de 100 µM i posteriorment es va afegir una barreja de citocines: IL-1β 50 U/ml (BD Pharmingen, Heidelberg, Alemanya, 1.5–4.5·10⁸ U/mg); TNF-α 1000 U/ml (BD Pharmingen, 0.35–1.8·10⁹ U/mg) i IFN-γ 1000 U/ml (BD Pharmingen, 0.2–1.0·10⁸ U/mg) (Liu D, 2000) durant 48 h o 72 h. Els illots es van rentar en tampó fosfat salí (*Phosphate Buffered Saline*, PBS), es van fixar en paraformaldehid (PFA; Merk, Darmstadt, Alemanya) 4% i es van incloure en parafina per durant 24 h per la posterior determinació de l'apoptosi per immunohistoquímica.

15. CONTINGUT D'INSULINA I DE DNA DELS ILLOTS

Seguint el mateix protocol que s'ha explicat a l'apartat anterior, es va realitzar una altra sèrie d'experiments amb la finalitat d'examinar el contingut d'insulina i de DNA dels illots, després de 48 h de tractament amb la barreja de citocines amb o sense la preincubació amb el z-VAD.fmk 100 µM.

Després de 48 h de tractament amb les citocines es van rentar els illots en PBS. Els illots es van sonicar (amb un aparell d'ultrasons de Dr. Hielscher, UP50H; Teltow, Alemanya) en PBS i es va determinar el contingut d'insulina i la quantitat de DNA de cada mostra.

Per determinar el contingut d'insulina dels illots sonicats es va usar un assaig comercial d'ELISA d'insulina de rata seguint les instruccions del fabricant (Mercodia AB, Uppsala, Suècia). L'absorvència de les mostres es va llegir usant el programa informàtic *Genesis* 2.16 (Labsystems, Albertville, MI, USA) i una longitud d'ona de 450 nm. Es van fer els experiments amb illots procedents de diferents aïllaments.

La mesura del DNA es va fer amb un assaig fluorimètric usant bisbenzimidida. La bisbenzimidida és una molècula fluorescent que s'uneix al DNA i que es detecta usant una longitud d'ona d'excitació de 356 nm i 448 nm d'emissió. Per fer la detecció es van usar 100 µl de la mostra problema i 900 µl de la solució de bisbenzimidida (Hoechst 33258, Sigma) de 0.1 µg/ml en tampó (4 M NaCl, 0.087 M Na₂HPO₄, 3.97 mM EDTA). La corba patró es va fer a partir d'una solució de DNA timus de vedella a 5 µg/ml de concentració. A partir d'aquesta concentració es van fer les diferents dilucions de la corba: 2.5 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.125 µg/ml, 0.05 µg/ml i 0 µg/ml. La mesura del DNA es va fer usant un fluorímetre F-2000 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan).

16. TRASPLANTAMENT D'ILLOTS

Els illots es van trasplantar el mateix dia de l'aïllament, directament després de la seva obtenció en el cas de les rates Lewis o bé després del cultiu amb l'inhibidor de les caspases en el cas dels ratolins C57BL/6. Els illots es van aspirar amb una punta de pipeta de 200 µl, es van deixar sedimentar i es van passar a un tub de polietilè PE-50 (Smiths Industries, Kent, Regne Unit) amb l'ajuda d'una xeringa Hamilton d'1 ml (Hamilton Company, Reno, USA). El tub es va centrifugar a 600 rpm durant 1 min per tal que els illots quedessin agrupats abans del trasplantament.

Es van anestesiar els animals receptors amb una barreja de ketamina (100 mg/kg), diazepam (7.5 mg/kg) i atropina (0.5 mg/kg) i.p. en el cas de les rates, o amb èter en el cas dels ratolins, i se'ls va fer una incisió lumbar. Es va exposar el ronyó esquerre i es va fer un petit tall en la part inferior de la càpsula renal per tal de poder introduir el tub amb els illots. Els illots es van injectar amb l'ajuda de la xeringa Hamilton fins al pol superior del ronyó. Un cop s'havien

injectat tots els illots el tall es va segellar usant un cauteritzador de baixa temperatura (AB Medica, S.A., Barcelona, Espanya) i es va suturar la ferida.

17. EXTRACCIÓ DELS EMPELTS

Es va anestesià l'animal de nou i s'exposà el ronyó. Per realitzar l'extracció es va retallar la càpsula renal per tot el voltant de l'empelt i després es va extreure. També es va fer una nefrectomia del ronyó per assegurar que la totalitat de l'empelt havia estat extret i que no quedaven restes de teixit insular.

Els empelts destinats a l'estudi d'expressió gènica es van submergir ràpidament en tampó de lisi per a realitzar l'extracció de l'RNA total. Els empelts destinats als estudis immunohistoquímics es van fixar en PFA 4% durant 24 h i es van incloure en parafina.

Els empelts es van pesar després de 24 h de fixació en PFA 4% per fer després la mesura de la massa beta recuperada a l'empelt. Es va eliminar tot l'excés de fixador per capil·laritat i es van pesar en una balança Mettler tipus AE240 (Mettler Instrument Corporation, USA).

18. EXTRACCIÓ DE L'RNA TOTAL

Es va fer l'extracció de l'RNA total dels illots de rata frescos, en cultiu i dels empelts de 500 illots usant un assaig comercial (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Crawley, Regne Unit) basat en el mètode de la guanidina-tiocianat. El teixit es va homogeneïtzar en el tampó de lisi amb una pipeta Pasteur de branca llarga i es va transferir a una columna amb una membrana de gel de sílice on l'RNA total s'uneix en afegir-hi etanol. Finalment l'RNA es va eluir en 50 µl d'aigua estèril. La concentració i la puresa de l'RNA obtingut es va mesurar per espectrofotometria amb la lectura de l'absorvència a 260 nm i 280 nm en l'espectrofotòmetre DU® 640 (Beckman, Fullerton, USA).

Per assegurar la integritat de l'RNA obtingut es van visualitzar les bandes 28S i 18S de l'RNA ribosòmic en un gel d'agarosa a l'1% i tinció amb bromur d'etidi en el qual es va carregar 1 µl de l'RNA obtingut i es va realitzar l'electroforesi a 70 V. El gel es va observar en un transil·luminador de llum ultraviolada (Figura 15).



Figura 15. Estat de l'RNA obtingut després de l'extracció. En el gel d'agarosa es poden veure les dues bandes corresponents a les dues subunitats de l'RNA ribosòmic 28S i 18S, on la banda de 28S té el doble d'intensitat que la de 18S, la qual cosa reflexa que no hi ha hagut degradació de les mostres.

19. SÍNTESI DEL DNA COMPLEMENTARI

Es va fer la síntesi del DNA complementari (cDNA) a partir d'1 µg de l'RNA total. Primer de tot, es van tractar les mostres amb DNasa (1 U/µl) (Promega, Madison, WI, USA) durant 30 min a 37°C per eliminar les possibles contaminacions amb DNA. Després es va fer una incubació amb els encebadors aleatoris o *random primers* (0.5 µg/µl) (Promega) i una barreja de dNTPs 10 mM (100 mM dGTP, 100 mM dATP, 100 mM dTTP, 100 mM dCTP, Invitrogen, USA) durant 10 min a 65°C en el termociclador Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). Aquesta incubació es va fer perquè la presència dels dNTPs afavoreix la unió dels encebadors a l'RNA. Després es va fer una primera incubació durant 10 min a 25°C amb 5× First Strand Buffer, 0.1 M DTT, 40 U RNasin (Promega) i 400 U de la transcriptasa inversa Superscript II RNasa H⁻ (Invitrogen) en un volum final de 40 µl. Aquesta incubació és necessària si s'usen els encebadors aleatoris. Passat aquest temps es va fer la incubació durant la qual es produïa la transcripció inversa de l'RNA a cDNA: 50 min a 42°C i 15 min a 70°C.

20. PCR QUANTITATIVA A TEMPS REAL

20.1. Principis de la PCR quantitativa a temps real

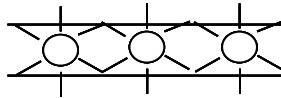
La tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) permet amplificar una seqüència determinada d'un gen i detectar-la. Teòricament, en qualsevol cicle de la fase exponencial de la reacció de PCR la quantitat de producte és proporcional al nombre inicial de còpies del gen però, a la pràctica, en mesures a temps final aquesta relació no es manté i una mateixa quantitat de partida pot donar quantitats finals de producte diferents.

La PCR quantitativa a temps real permet la detecció del producte a cada cicle de la reacció. Això s'aconsegueix amb l'addició d'una molècula fluorescent a la reacció que emet fluorescència al mateix temps que el número de còpies va creixent, de manera que la PCR es pot monitoritzar, proporcionant un mètode de detecció més acurat que la PCR tradicional.

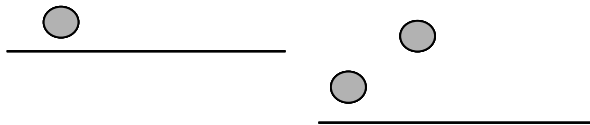
Hi ha dues maneres bàsiques d'introduir la fluorescència en la reacció i poder monitoritzar-la:

– Tècnica SYBR® Green (Figura 18). S'usa una molècula fluorescent que s'uneix al DNA de doble cadena. A mesura que la PCR avança i es produeix més DNA de doble cadena hi ha més unió del fluorocrom al DNA i la intensitat de l'emissió de la fluorescència augmenta. En aquest cas, el fluorocrom que s'usa no és específic per el gen que es vol detectar però sí ho són els encebadors.

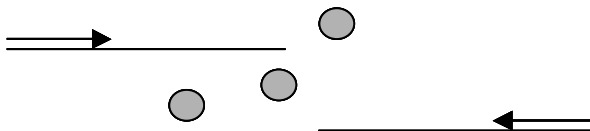
1. La molècula de SYBR® Green s'uneix a la doble cadena de DNA i emet fluorescència



2. Amb la desnaturalització del DNA, SYBR® Green s'allibera al medi i no emet fluorescència



3. Comença la fase d'extensió de les noves molècules de DNA amb la unió dels encebadors específics



4. Quan s'ha completat la polimerització, la molècula de SYBR® Green s'uneix a la doble cadena resultant i emet fluorescència

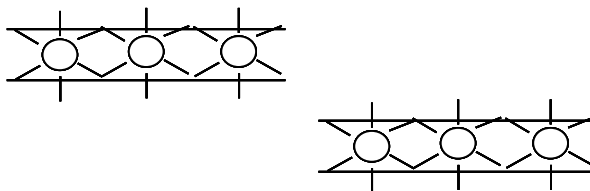


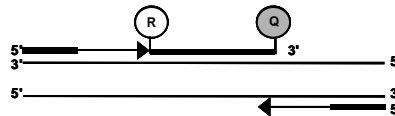
Figura 16. La fluorescència s'introdueix a la reacció de la PCR mitjançant el fluorocrom SYBR® Green. Quan aquesta molècula està unida al DNA de doble cadena emet fluorescència, però quan el DNA està desnaturalitzat el fluorocrom s'allibera al medi i no emet fluorescència. A mesura que va avançant la reacció de la PCR i es van sintetitzant noves cadenes de DNA l'emissió de fluorescència augmenta i queda enregistrat en l'aparell, donant la mesura de fluorescència a cada cicle de la PCR.

– Assaig 5' nucleasa (sondas TaqMan®) (Figura 19). S'usen encebadors específics per al gen que es vol detectar i una sonda específica marcada amb dos fluorocroms. El fluorocrom de l'extrem 5' de la sonda (*reporter*) emet fluorescència que absorbeix el fluorocrom de l'extrem 3' (*quencher*). Mentre la sonda està intacta, la fluorescència global és nul·la. A mesura que la reacció avança l'activitat 5' nucleasa de la polimerasa comença a desplaçar la sonda i a trencar-la. Aquest trencament fa que els dos fluorocroms de la sonda se separin i que el *reporter* pugui emetre la fluorescència ja que el *quencher* no pot tamponar en estar separats.

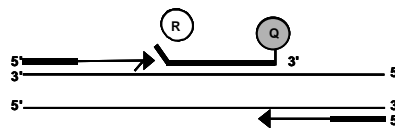
1. La sonda específica per el gen que es vol detectar conté dos fluorocroms : *reporter* (emet fluorescència) i *quencher* (absorbeix la fluorescència emesa per el *reporter* quan estan suficientment propers)



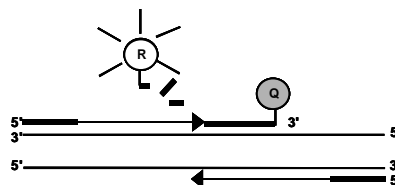
2. Els encebadors específics i la sonda s'uneixen i comença l'extensió de les noves cadenes



3. La polimerització avança i l'activitat 5' nucleasa de l'enzim desplaça la sonda



4. La sonda es trenca i s'allibera el *reporter* que comença a emetre fluorescència



5. Es completa la polimerització

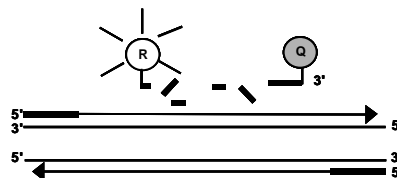


Figura 17. La fluorescència s'incorpora a la reacció de PCR per el mètode de l'assaig 5' nucleasa que utilitza una sonda i uns encebadors específics per el gen que es vol detectar. La sonda i els encebadors s'uneixen al DNA i comença la polimerització. Quan l'enzim arriba a la sonda, l'activitat 5' nucleasa de la polimerasa la desplaça i l'acaba trencant. Això fa que el fluorocrom que emet la fluorescència (R, *reporter*) se separi de l'altre fluorocrom (Q, *quencher*) i que s'emeti la fluorescència. A mesura que es van sintetitzant noves cadenes de DNA l'emissió de fluorescència augmenta i queda enregistrat en l'aparell, donant la mesura de fluorescència a cada cicle de la PCR.

Durant els primers cicles de la PCR la quantitat de producte que hi ha en la mostra és molt petita i l'emissió de fluorescència és molt baixa (nivell basal o *background* de fluorescència).

El punt de la reacció en el qual hi ha un nombre suficient de producte com perquè la fluorescència que es detecta estigui significativament per sobre del nivell basal de fluorescència s'anomena cicle llindar (C_T , *Threshold cycle*) i és el punt on comença la fase exponencial de la PCR. Aquest punt és el primer on el nombre de còpies que hi ha a la mostra és proporcional al nombre de còpies inicial. Com més gran és el nombre de còpies inicial del gen abans es detectarà la fluorescència. Utilitzant una corba patró es pot convertir el valor de C_T en quantitat de producte inicial.

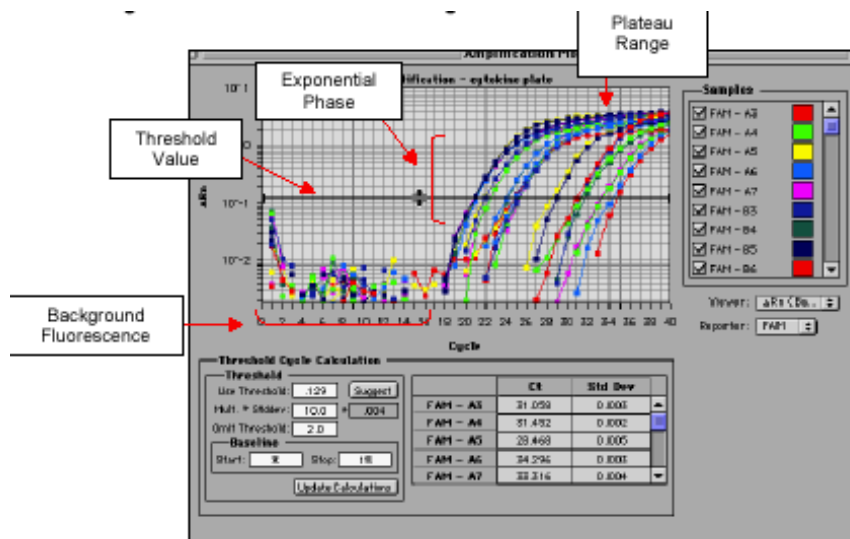


Figura 18. Esquema on es mostren les diferents fases de la PCR. En la primera zona la quantitat de producte és molt petita i només es detecta una fluorescència de fons (*background fluorescence*). La següent fase és la fase exponencial, on la quantitat de producte és proporcional a la quantitat de còpies inicials. En la tercera fase (*plateau range*) la reacció es comença a aturar i ja no es produeix més producte (les mesures a temps final o tradicionals mesuren la quantitat de producte en aquest moment). Extret de User Bulletin #2, ABI Prism® 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression. Applied Biosystems, 1997.

20.2. Quantificació de l'expressió gènica de citocines per PCR quantitativa a temps real

Es va aplicar la tecnologia de la PCR quantitativa a temps real per amplificar i quantificar els gens de les següents citocines: IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 i IL-4 en les mostres d'illots frescos de rata Lewis (n = 6), cultivats durant 24 h (n = 6) i en els empelts d'1 (n = 6), 3 (n = 6) i

7 ($n = 6$) dies trasplantats a receptors normoglicèmics i hiperglicèmics. Per fer-ho es van utilitzar PDARs (*Pre-Development TaqMan[®] Assay Reagents*, Applied Biosystems, Cheshire, Regne Unit), que són el preparat comercial dels encebadors i la sonda TaqMan[®] específics per cadascun dels gens.

Com a gen normalitzador (*housekeeping*) es va usar 18S, la subunitat petita de l'RNA ribosòmic (rRNA). El nostre grup ha comprovat que en el nostre model l'expressió d'aquest gen es manté constant en les diferents condicions de l'estudi (Rodríguez-Mulero S, 2005.).

Els resultats es van expressar com ΔC_T que és la diferència de C_T entre la mostra problema i el normalitzador (18S). Per a poder realitzar la detecció dels gens problemes primer calia establir un llindar de fluorescència amb una recta patró per a cadascun dels gens, que després s'utilitzaria cada vegada que es detectés un mateix gen. Amb aquestes mateixes corbes també es va poder establir que les eficiències d'amplificació dels diferents gens problema amb el 18S eren similars. A partir d'una mostres d'empelt d'un dia on s'expressava el nostre gen d'interès es van fer les diferents dilucions per a realitzar la corba patró: 1 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} i 10^{-4} per el gen problema i 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} i 10^{-7} per el gen normalitzador. Les dilucions per el gen normalitzador són més grans perquè el gen 18S en les nostres mostres apareixia a cicles de la PCR molt inicials (la qual cosa indicava la molt alta expressió en aquestes mostres) i calia diluir-lo per assegurar-nos que treballàvem en la zona exponencial de la PCR. L'amplificació dels dos gens es va fer en diferents pous i seguint les condicions estàndard d'amplificació (95°C durant 10 min, 40 cicles de 95°C durant 15 s i 60°C durant 1 min). Perquè els dos gens presentessin la mateixa eficiència d'amplificació calia que, en representar el logaritme de la dilució enfront de la diferència de C_T entre el gen problema i el gen normalitzador, la pendent de la recta fos inferior a 0.1 (User Bulletin #2, ABI Prism[®] 7700 Sequence Detection System, Relative Quantitation of Gene Expression. Applied Biosystems, 1997.).

La detecció del gen problema i de 18S es va fer en pous diferents i per triplicat per a cada mostra. Per cada reacció de PCR es va partir d'1 μl de cDNA (corresponent a 25 ng de RNA per al gen problema i 25 pg de RNA per al 18S) que es va barrejar amb $2\times$ TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (12.5 μl), $20\times$ d'encebadors i sonda específics per al gen problema o per al gen normalitzador (PDAR) (1.25 μl) en 25 μl de volum final. L'amplificació es va fer usant el termociclador ABI Prism[®] 7700 (Applied Biosystems) i seguint el programa d'amplificació estàndard: 95°C durant 10 min, seguit de 40 cicles de 95°C durant 15 s i 60°C durant 1 min.

21. IMMUNOHISTOQUÍMICA

Es van usar seccions de 2 μm de gruix de les diferents peces fixades en PFA 4% durant 24 h i incloses en parafina per realitzar les diferents immunohistoquímiques. Es va fer el marcatge per a la IL-1 β , l'iNOS i un marcador de la línia de cèl·lules monòcit-macròfag (CD68) en empelts d'1 i 3 dies de rates Lewis normoglicèmiques. Aquest marcatge es va detectar usant la microscòpia confocal. A més a més, es va realitzar la immunohistoquímica de pàncrees, d'illots frescos, d'illots cultivats en les diferents condicions i d'empelts de 3 i 30 dies de ratolins C57BL/6 diabètics de l'estudi de la inhibició de l'apoptosi per a quantificar la mort cel·lular i la massa de les cèl·lules beta. Aquestes peces es van tenyir amb la tècnica del TUNEL i amb una barreja d'anticossos per a les cèl·lules que no són beta dels illots. Es van visualitzar usant la microscòpia òptica.

21.1. Immunohistoquímica de CD68 per microscòpia òptica

Es va determinar la presència i distribució del marcador de macròfag CD68 en pàncrees, illots frescos i en empelts d'1, 3, i 7 dies. Com a control positiu es van usar seccions de melsa de rates Lewis sanes. Després de la desparafinització, l'exposició dels antígens es va realitzar amb l'ebullició de les preparacions en tampó citrat (82 mM de citrat trisòdic i 20 mM d'àcid cítric) amb un pH de 6.0, durant 20 min. Després es va fer la inhibició de les peroxidases endògenes en una solució de PBS, metanol i peròxid d'hidrògen a l'1% durant 30 min. Es van bloquejar les unions inespecífiques amb sèrum de cavall (Biological Industries) diluït en PBS al 5% durant 1 h a temperatura ambient i posteriorment es va fer la incubació amb l'anticòs de ratolí contra la proteïna CD68 de rata (Serotec, Oxford, Regne Unit) a una dilució 1:100, durant tota la nit a 4°C. La detecció del marcatge es va fer usant l'assaig comercial ImmunoPure[®] ABC peroxidase mouse Ig G (Pierce, Rockford, IL, USA), seguint les instruccions del fabricant. Per detectar la peroxidasa es va utilitzar com a substrat 3,3-diaminobenzidina tetrahidroclorur (DAB, Sigma). Els nuclis es van contratenyir amb Hematoxilina de Harris. Les preparacions es van observar en un microscopi Olympus BX-51.

21.2. Tinció de IL-1 β , iNOS, CD68 per microscòpia confocal

Es va realitzar el marcatge per a IL-1 β , iNOS, i CD68 en seccions d'empelts de rates Lewis normoglicèmiques d'1 i 3 dies després del trasplantament. Es van fer dobles tincions per IL-1 β i CD68 o per iNOS i CD68 i el marcatge es va visualitzar en un microscopi confocal (Leica TC6-SL).

Com a controls positius es van usar:

- per IL-1 β : illots de rata Lewis tractats amb 50 ng/ml de TNF- α + 750 U/ml de IFN- γ + 10 μ g/ml de lipopolisacàrid (LPS) durant 4 h (Arnush M, 1998)
- per iNOS: illots de rata Lewis tractats amb 50 U/ml de IL-1 β durant 24 h (Corbett JA, 1995)

Després de la desparafinització, i de l'exposició dels antigens per ebullició de les preparacions en tampó citrat, es van bloquejar les unions inespecífiques amb sèrum de cavall (Biological Industries) diluït en PBS al 5% durant 1 h a temperatura ambient. La incubació amb els anticossos primaris es va fer durant tota la nit a 4°C. Per a la detecció d'IL-1 β es va usar un anticòs de cabra contra IL-1 β de rata (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) a una dilució 1:30; per detectar l'iNOS, un anticòs de cabra contra iNOS de rata i ratolí (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) a una dilució 1:10 i un anticòs de ratolí contra la proteïna CD68 de rata (Serotec) a una dilució 1:100. Després de tres rentats en PBS es va realitzar una tinció en Sudan Black B (Sigma) preparat en etanol 70° a saturació, durant 30 min per apantallar l'autofluorescència del teixit i de la parafina. La tinció es va aturar amb dos rentats ràpids en etanol 70° i tres rentats en PBS. Seguidament es va fer la incubació amb el anticossos secundaris conjugats amb fluorocroms en el cas de la microscòpia confocal durant 1 h a temperatura ambient. Es va usar un anticòs d'ase anti-cabra conjugat amb FITC (Abcam, Cambridge, Regne Unit) (dóna fluorescència verda) a una dilució de 1:400 per detectar la senyal de IL-1 β i d'iNOS. Per detectar CD68 es va usar un anticòs de conill anti-Ig G de ratolí conjugat amb Alexa Fluor®546 (Molecular Probes, Leiden, Països Baixos) (dóna fluorescència vermella). Les dilucions emprades van ser 1:400 per cadascun dels anticossos secundaris. Després d'això les preparacions es van incubar durant 10 min a temperatura ambient amb DRAQ5™ (que s'uneix amb alta afinitat amb el DNA i que dóna fluorescència en el vermell llunyà) (Biostatus Limited, Leicestershire, Regne Unit). Les seccions es van muntar amb medi de muntatge especial per a fluorescència (Dako) i es van observar en un microscopi confocal.

21.3. Quantificació de la mort cel·lular

21.3.1. Apoptosi

21.3.1.1. *Tècnica del TUNEL (terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling)*

Per la detecció de l'apoptosi es va utilitzar l'assaig comercial ApopTag® (Intergen, Oxford, Regne Unit) basat en la tècnica del TUNEL i es va fer una doble tinció, amb la peroxidasa per

el TUNEL i la fosfatasa alcalina per detectar les cèl·lules endocrines no beta dels illots (Figura 19).

La tècnica del TUNEL detecta els talls que es produeixen en el DNA durant el procés d'apoptosi perquè es fa un marcatge enzimàtic amb la desoxinucleotidil transferasa dels extrems 3'-OH lliures amb nucleòtids modificats amb digoxigenina. Després s'uneix un anticòs anti-digoxigenina conjugat amb la peroxidasa. Per detectar la peroxidasa es va utilitzar com a substrat la DAB (Sigma). Per fer aquesta tinció es va seguir el protocol del fabricant.

Després de la tinció de TUNEL, les preparacions es van incubar amb una solució d'àcid acètic al 15% durant 15 min per tal d'inhibir l'activitat de les fosfatases alcalines endògenes i seguidament es van incubar amb una solució de PBS i sèrum de xai (Gibco Invitrogen, Paisley, Regne Unit) al 5% durant 20 min a temperatura ambient per bloquejar les unions inespecífiques. Es va fer un tractament amb Tween 20 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) al 0.2% diluït amb PBS, per permeabilitzar les preparacions i es van incubar amb una barreja d'anticossos de conill (anti-glucagó humà a una dilució final 1:500, anti-somatostatina humà dilució final 1:500 i anti-polipèptid pancreàtic humà dilució final 1:1000; tots tres de Dako, Glostrup, Dinamarca) durant tota la nit a 4°C per detectar les cèl·lules endocrines no beta dels illots. Es van tenyir les cèl·lules de l'illot que no són beta perquè la hiperglucèmia greu s'associa a una degranulació de les cèl·lules beta i això fa que amb la tinció amb anticòs anti-insulina es puguin donar falsos negatius. Passat aquest temps es van fer rentats amb Tween 20 diluït amb PBS al 0.05% i una incubació de 3 h a temperatura ambient amb l'anticòs secundari anti-Ig G de conill (Dako). Seguidament les seccions es van rentar amb una solució de PBS-Tween 20 al 0.05% i amb una solució de Tris-HCl. Es van incubar amb un anticòs anti-fosfatasa alcalina de conill a una dilució final 1:50 (Sigma) a temperatura ambient durant 1 h i es van tenyir usant com a substrat el 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfatasa/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT, Sigma) durant uns 45 min. La contratinció de les preparacions es va fer amb Hematoxilina de Mayer (Sigma) i es van muntar en medi de muntatge aquós Aquatex (Merk, Darmstadt, Alemanya).

La tinció del TUNEL no és exclusiva de les cèl·lules apoptòtiques ja que l'enzim usat s'uneix a tots els extrems 3'-OH que resulten de la fragmentació del DNA, ja sigui per apoptosi o per d'altres processos que tenen lloc en la cèl·lula. Així doncs, per quantificar l'apoptosi es van aplicar els criteris morfològics que la defineixen (vegeu l'apartat 3.2 de la Introducció) i es van prendre com a cèl·lules positives aquelles cèl·lules que els complien. En la necrosi també es produeixen talls en el DNA, així que per la quantificació de l'apoptosi es van excloure les zones necròtiques perquè poden conduir error ja que es poden tenir en compte falsos positius.

Per als illots de l'estudi del cultiu amb citocines es va fer només la tinció de TUNEL i es van contratenyir els nuclis amb l'hematoxilina de Harris (Sigma).

Les cèl·lules i els nuclis apoptòtics es van comptar usant un microscopi Olympus BH2 connectat a una camera de vídeo en un monitor en color. Es van comptar 1.000 nuclis, com a mínim, per cada peça i el resultat es va expressar com a nuclis apoptòtics respecte el total de cèl·lules (per als illots dels experiments *in vitro* amb les citocines) i com a nuclis apoptòtics respecte les cèl·lules beta (per als empelts, illots frescos i els pàncrees). Es van comptar totes les cèl·lules endocrines de cada secció i quan es va requerir es van afegir més seccions.

L'apoptosi de les cèl·lules beta dels illots immediatament abans del trasplantament es va determinar en set grups de 150 illots frescos de ratolí C57BL/6. Després de l'aïllament els illots es van rentar en PBS i es van fixar en PFA 4%. A les seccions dels illots frescos se'ls va fer una doble tinció per al TUNEL i per a les cèl·lules endocrines no beta del pàncrees tal i com s'ha descrit anteriorment. A més, també es va determinar l'apoptosi de les cèl·lules beta en vuit pàncrees de ratolins C57BL/6 control. Per a l'extracció del pàncrees es va realitzar una laparotomia mitja amb l'animal anestesià i es va exposar el pàncrees. L'animal es va sacrificar i es va extreure el pàncrees i es va fixar en PFA 4%. Per determinar l'apoptosi de les cèl·lules beta aquestes seccions també van estar doblement tenyides i comptades com s'ha descrit per els empelts i els illots aïllats.

21.3.1.2. Iodur de propidi

Com ja s'ha dit en l'apartat anterior la tècnica de TUNEL no tenyeix exclusivament les cèl·lules apoptòtiques i cal aplicar criteris morfològics per determinar si una cèl·lula tenyida és apoptòtica o no. Per això vam voler comprovar els resultats obtinguts utilitzant una altra tècnica, la tinció per iodur de propidi (IP).

IP és un colorant fluorescent que s'uneix al DNA en les peces fixades i permet la detecció de nuclis condensats i fragmentats característics de les cèl·lules apoptòtiques (Figura 21). La comprovació es va fer en els experiments dels illots de ratolí C57BL/6 tractats amb la barreja de citocines durant 48 h i preincubats amb z-VAD.fmk 100 μ M durant 2 h. Les seccions d'aquests illots es van incubar amb una solució de IP (Sigma) 100 μ g/ml i RNasa A (Sigma) 100 μ g/ml durant 30 min a 37°C. Després es van rentar les seccions amb PBS i es van muntar amb medi de muntatge especial per a fluorescència (Dako). Les cèl·lules apoptòtiques es van identificar en el microscopi de fluorescència utilitzant un filtre per la rodamina per la

condensació i/o fragmentació del seu nucli. L'apoptosi s'expressa com el percentatge de cèl·lules apoptòtiques sobre el total de cèl·lules.

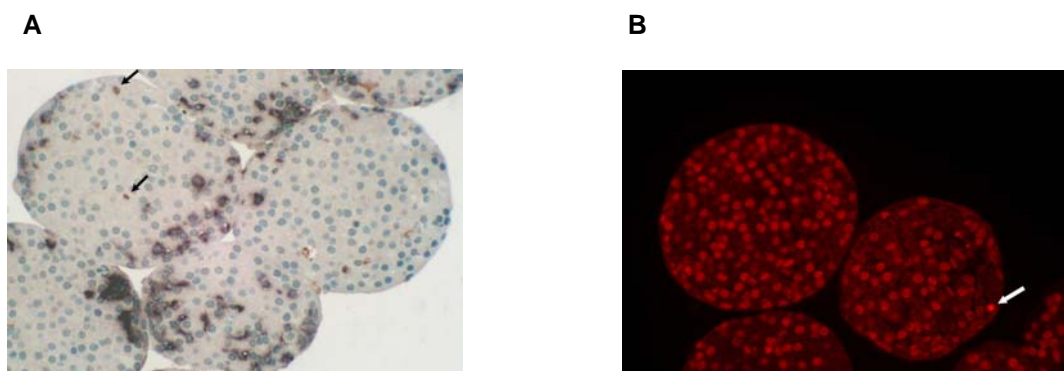


Figura 19. Imatge de nuclis apoptòtics tenyits per la tècnica del TUNEL (A) on els nuclis positius queden tenyits de color marró (la tinció blavosa correspon a les cèl·lules endocrines no beta dels illots), o per iodur de propidi (IP) (B) on els nuclis positius estan condensats i es veuen més brillants.

21.3.2. Àrea de necrosi insular

Per mesurar l'àrea insular necròtica es van usar les mateixes seccions on també es va quantificar la massa de les cèl·lules beta. El mètode usat va ser la morfometria per comptatge de punts (Weibel ER, 1979). Les seccions visualitzades al monitor es van cobrir amb una plantilla de 48 punts i es va comptar el número de punts sobre les cèl·lules beta, no beta, teixit endocrí i àrees necròtiques. El nombre de punts que es va comptar per cada secció era el suficient perquè l'error estàndard relatiu fos inferior al 10% i així tenir una mostra representativa de la peça. L'àrea de necrosi es va expressar com el percentatge de punts sobre el teixit necròtic dividit pels punts sobre el teixit insular (tant les cèl·lules beta com les no beta de l'illot) i necròtic.

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

Per la quantificació de la massa de cèl·lules beta es va usar el pes de la mostra i el volum relatiu de les cèl·lules beta obtingut mitjançant la morfometria per comptatge de punts (Weibel ER, 1979).

La massa de les cèl·lules beta es va obtenir multiplicant el pes de l'empelt per el volum relatiu de les cèl·lules beta. El volum relatiu de les cèl·lules beta correspon al nombre de punts de cèl·lules beta dividit per els punts totals de teixit mesurat.

Per a obtenir la massa que inicialment es trasplantava, es va determinar la massa beta pellets de 150 illots frescos de ratolí C57BL/6 ($n = 10$) i també la massa beta de 150 illots després de 3 dies de cultiu ($n = 9$). Els illots es van rentar en PBS i es van fixar durant 24 h en PFA 4%, es va eliminar l'excés de PFA per capil·laritat i es va pesar el pellet d'illots. La massa beta es va obtenir multiplicant el pes dels 150 illots per el percentatge de volum relatiu de les cèl·lules beta determinat amb un programa d'anàlisi d'imatge (AnalySIS 3.0; Soft Imaging System, Münster, Alemanya), en el qual es mesurava l'àrea relativa de cèl·lules beta respecte al total de l'illot.

22. ANÀLISI ESTADÍSTICA

Els resultats s'expressen com a mitjana i error estàndard de la mitjana (mitjana \pm EEM). Per a les comparacions múltiples entre grups es van usar l'anàlisi de la variança d'un factor (ANOVA) o la prova de Kruskal-Wallis, segons si les variàncies de les mostres eren homogènies o no i si les dades seguien una distribució normal o no. Quan l'ANOVA va detectar diferències significatives es va usar el mètode PLSD (*Protected Least Significant Difference*) de Fisher per determinar les diferències significatives específiques entre els grups analitzats. Quan la prova de Kruskal-Wallis va determinar diferències es va usar la prova de Mann-Whitney per detectar les diferències específiques entre els grups. Per a considerar que hi havia significació estadística es va prendre $p < 0.05$. Es va utilitzar el Mètode Sequencial de Hochberg per a ajustar l'error de tipus 1 (α) en les comparacions múltiples. De totes maneres i com que aquests mètodes d'ajustament de l' α han estat bastant criticats (Perneger TV, 1998) ja que fan augmentar l'error de tipus 2, en els resultats es posa el valor de la prova de Mann-Whitney, seguit del resultat del mètode de Hochberg. Per a realitzar les anàlisis es va usar el paquet estadístic SPSS® versió 12.0 per Windows (SPSS Inc., USA) i el Programa Multiplicity del Departament de Biomatemàtiques de la Universitat de Texas MD, Anderson Cancer Center (Houston, TX).