

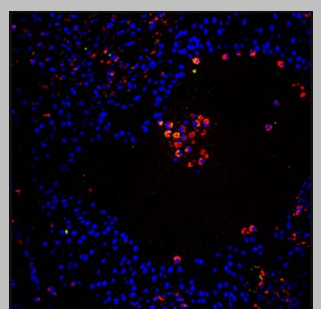
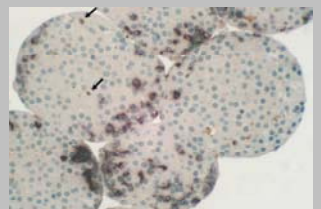
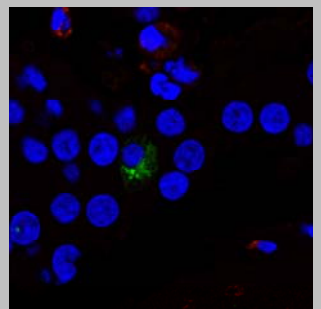
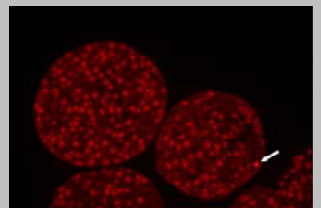
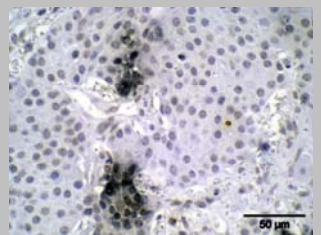
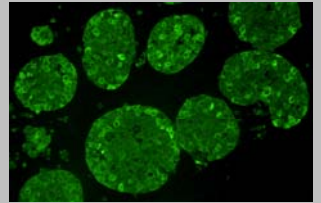
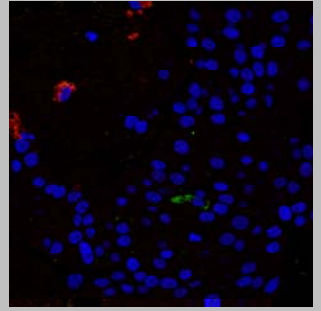
UNIVERSITAT DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE CIÈNCIES CLÍNiques

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

Marta Montolio Rusiñol

2006



RESULTATS

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

Els primers dies després del trasplantament es produeix una important pèrdua de la massa trasplantada tan per processos de necrosi com d'apoptosi. En aquests primers dies es produiria un procés d'inflamació inespecífic durant el qual la síntesi i secreció de diferents mediadors citotòxics com són les citocines podrien jugar un paper important en l'estimulació de la mort cel·lular. Així doncs, es va voler estudiar la presència de diferents citocines en l'empelt en un model de trasplantament d'illots singènics en rates Lewis i el patró d'expressió que seguïen durant els primers dies després del trasplantament. És ben conegut que la hiperglucèmia té un efecte deleteri sobre la funció i la supervivència de l'empelt, i per poder estudiar si les condicions metabòliques del receptor també tenien un efecte sobre l'expressió de les diferents citocines es va treballar amb animals normoglucèmics i hiperglucèmics.

23. EVOLUCIÓ METABÒLICA DELS ANIMALS TRASPLANTATS

Tots els animals eren comparables en quan a pes i glucèmia quan es van injectar amb l'estreptozotocina (STZ) (65 mg/kg de pes). Un 96.3% de les rates injectades van complir les condicions d'hiperglucèmia (>20 mmol/l en dues mesures consecutives), poliúria i polidípsia després de la injecció i varen ser trasplantades.

El dia de la injecció amb l'STZ els animals presentaven unes glucèmies de 5.6 ± 0.1 mmol/l i set dies després de la injecció (el dia del trasplantament) les glucèmies dels animals eren de 28.3 ± 1.0 mmol/l. Els animals es van distribuir de manera aleatòria en tres grups segons el dia en que s'extrauria l'empelt. En la Taula 2 es descriuen les glucèmies i els pesos de tots els grups en el moment del trasplantament i en el de l'extracció de l'empelt.

Taula 2. Característiques dels grups experimentals

Grup	Dia extracció	n	Dia del trasplantament		Dia de l'extracció	
			Glucèmia (mmol/l)	Pes (g)	Glucèmia (mmol/l)	Pes (g)
Normoglucèmia	1	6	6.4 ± 0.5	214 ± 9	5.5 ± 0.1	203 ± 8
	3	6	5.7 ± 0.2	235 ± 11	5.5 ± 0.2	233 ± 11
	7	6	6.1 ± 0.2	220 ± 5	5.3 ± 0.1	242 ± 7
Hiperglucèmia	1	6	25.8 ± 1.6	195 ± 7	25.9 ± 1.2	195 ± 6
	3	6	30.1 ± 1.3	202 ± 6	22.7 ± 1.9	203 ± 5
	7	6	29.0 ± 2.0	195 ± 6	23.2 ± 2.1	208 ± 3

Cinc-cents illots corresponen a una massa insuficient per a restablir la normoglicèmia i els animals hiperglicèmics trasplantats amb aquest nombre d'illots mantenien la hiperglicèmia en el moment de l'extracció de l'empelt (Taula 2). Per tant, aquest model de trasplantament ens permetia estudiar l'expressió de citocines en els illots trasplantats i l'efecte de la glucèmia sobre aquesta expressió.

24. QUANTIFICACIÓ DE RNA TOTAL

De 500 illots frescos es van obtenir $9.9 \pm 1.0 \mu\text{g}$ d'RNA total (Figura 20). Aquesta quantitat era molt similar en els illots que havien estat cultivats durant 24 h ($11.0 \pm 0.8 \mu\text{g}$). En canvi, després del trasplantament la quantitat d'RNA total obtinguda disminuïa de manera important en tots els grups ($p < 0.001$) fins a aproximadament un 40% de l'RNA total obtingut dels 500 illots frescos. No es van trobar diferències estadísticament significatives entre la quantitat d'RNA total obtinguda dels empelts de diferents dies ni entre les diferents condicions metabòliques dels receptors.

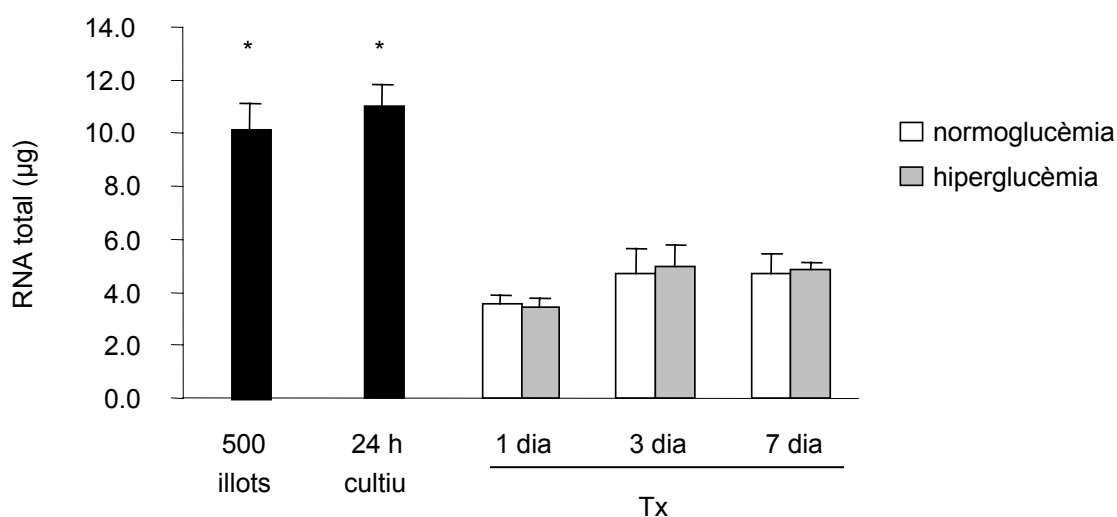


Figura 20. RNA total obtingut de les diferents condicions: 500 illots frescos, 500 illots després de 24 h de cultiu en medi RPMI-1640 amb 11.1 mM de glucosa i 10% FCS i empelts de 500 illots 1, 3 i 7 dies després del trasplantament en rates Lewis normoglicèmiques o hiperglicèmiques. Tx: Trasplantament. Els resultats són la mitjana \pm EEM. ANOVA, $p < 0.001$; Fisher, * $p < 0.001$ entre els illots frescos i els cultivats 24 h i la resta de condicions.

25. ESTABLIMENT DEL LLINDAR DE FLUORESCÈNCIA I EFICIÈNCIES D'AMPLIFICACIÓ DE LES REACCIONS DE PCR

Abans de quantificar la presència de cadascun dels gens en els empelts es va fer una corba patró per poder establir el llindar (*t: threshold*) de fluorescència amb què es treballaria per cada gen problema. Aquesta mateixa corba patró servia per veure si l'eficiència d'amplificació del gen problema i del gen normalitzador eren similars. Per això calia que, en representar el logaritme de la dilució enfront de la diferència de C_T entre el gen problema i el gen normalitzador de totes les dilucions, i fer la recta de regressió, 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.).

Les corbes patró per a cada gen es van fer a partir de l'RNA total d'un empelt de 500 illots extret el dia 1 després del trasplantament on s'havia comprovat que el gen d'interès s'expressava en suficient quantitat com per poder fer les diferents dilucions. Per el gen problema les dilucions van ser: 1 (mostra sense diluir), 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} i 10^{-4} , i per al gen normalitzador (18S): 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} i 10^{-7} . En la figura 21 es mostren les rectes per a cadascun dels gens. Per a tots la pendent de la recta de regressió fou <0.1 .

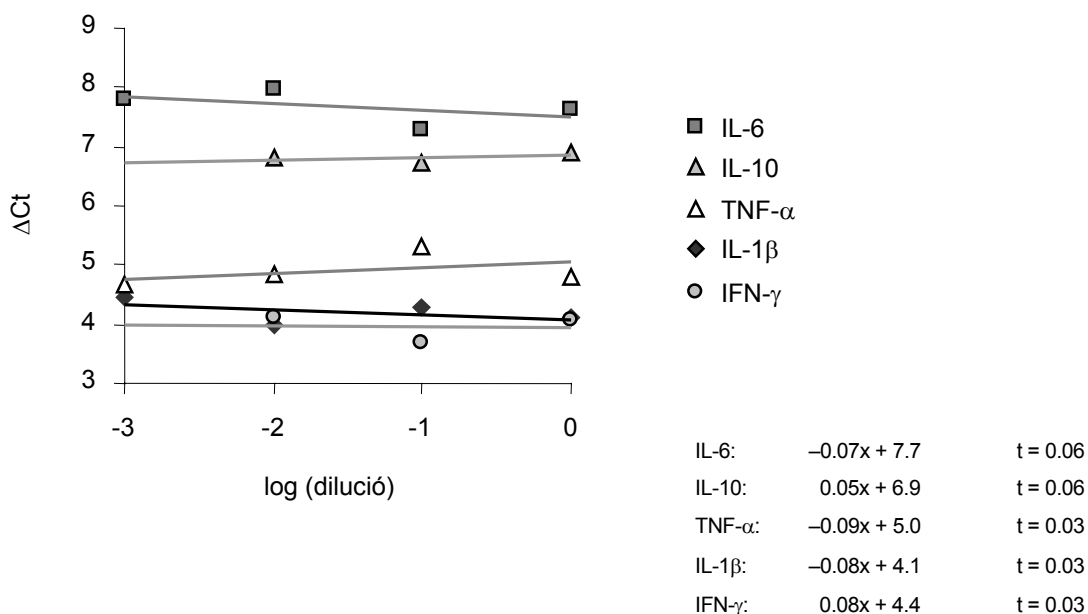


Figura 21. Comprovació de les eficiències del gen problema i el gen normalitzador. Rectes de regressió i representació gràfica de la diferència de C_T (gen problema – 18S) vs. el logaritme de la dilució per cadascun dels gens estudiats. *t*: llindar de fluorescència establert per a cadascun dels gens.

Amb aquestes corbes patró vam comprovar que l'eficiència de l'amplificació de la PCR per el gen problema i el normalitzador (18S) eren iguals emprant aquestes condicions determinades i aquests encebadors i sondes en concret (PDARs). A més, amb la mateixa corba patró i per cada gen problema es va establir el valor llindar de fluorescència, de manera que es podien comparar els resultats obtinguts en diferents plaques.

26. QUANTIFICACIÓ DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DE LES CITOCINES

En els illots frescos immediatament després de l'aïllament es va poder detectar, tot i que a baixos nivells, l'mRNA de IL-1 β i de TNF- α , mentre que els transcrits de IL-6 i IL-10 eren pràcticament indetectables. En els illots cultivats durant 24 h es va detectar l'expressió de les quatre citocines. L'expressió de totes elles estava augmentada de manera molt important el dia 1 després del trasplantament i disminuïa els dies 3 i 7, tot i que generalment, a excepció de la IL-6 es mantenien a nivells superiors als dels illots frescos i en cultiu. No es va poder detectar mRNA de IL-4 en cap de les mostres estudiades. En el cas d'IFN- γ , l'aparició a cicles molt tardans de la PCR feia que no es pogués quantificar, tot i que en la majoria de les mostres era detectable. Així doncs, l'anàlisi detallat de l'expressió de les citocines es va limitar a aquelles citocines que es van poder detectar d'una manera consistent i que van permetre la seva quantificació.

26.1. Expressió d'IL-1 β

En els illots frescos immediatament després de l'aïllament la IL-1 β es va detectar a cicles molt tardans de la reacció de PCR (31.2 ± 0.18), indicant la molt baixa expressió en els illots frescos. A les 24 h de cultiu la IL-1 β apareixia als mateixos cicles (32.4 ± 0.5).

El dia 1 després del trasplantament es produïa un augment molt important de l'expressió tant en el grup normoglicèmic com l'hiperglicèmic ($p = 0.002$) sense presentar diferències significatives entre ells (Figura 22). El dia 3 els nivells d'expressió de IL-1 β disminuïen en els dos grups respecte el dia 1, tot i mantenir-se superiors als illots frescos ($p = 0.002$) i als illots cultivats ($p = 0.002$). Aquests nivells es mantenien el dia 7. Les diferències significatives es mantenien després de la correcció de Hochberg per a les comparacions múltiples. La hiperglicèmia no va modificar l'expressió de la IL-1 β en cap dels temps estudiats.

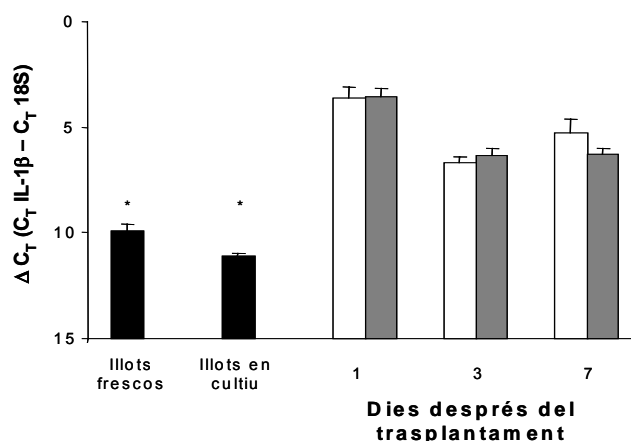


Figura 22. Expressió de la IL-1 β en illots frescos, illots en cultiu i empelts (n = 6 per a cada grup experimental). Els valors s'expressen com a la mitjana \pm EEM de ΔC_T . ΔC_T és el resultat de la normalització de l'expressió del gen de la citocina respecte el control endògen (18S). Com que l'estudi de l'expressió es fa quan la reacció de PCR es troba en la fase exponencial, una diferència de només un cicle representa el doble de còpies del gen en una mostra que en l'altra. Així doncs, cal remarcar que petites diferències entre les mostres poden representar una gran diferència en quan al nombre de còpies de mRNA de la citocina. Les barres negres representen els illots (frescos i en cultiu, tal com s'indica a la figura), les barres blanques corresponen als grups normoglicèmics i les grises als grups hiperglicèmics. Kruskal-Wallis, $p < 0.001$. U Mann-Whitney, * $p = 0.002$ vs. tots els grups trasplantats.

26.2. Expressió de TNF- α

TNF- α es va detectar a cicles tardans de la PCR tant en els illots frescos (32.8 ± 0.1) com en els illots cultivats durant 24 h (33.8 ± 0.5). El patró temporal d'expressió de TNF- α seguia pràcticament el mateix que el de la IL-1 β .

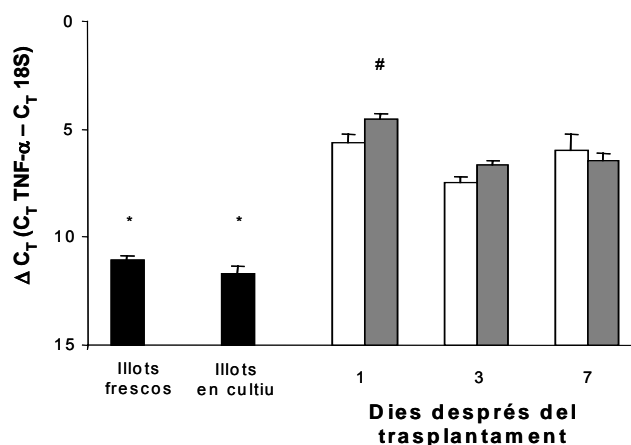


Figura 23. Expressió del TNF- α en illots frescos, illots en cultiu i empelts (n = 6 per a cada grup experimental). Els valors s'expressen com a la mitjana \pm EEM de ΔC_T . Les barres negres representen els illots (frescos i en cultiu, tal com s'indica a la figura), les barres blanques corresponen als grups normoglicèmics i les grises als grups hiperglicèmics. Kruskal-Wallis, $p < 0.001$. U Mann-Whitney, * $p = 0.002$ vs. tots els grups trasplantats. # $p = 0.026$ vs. grup de receptors normoglicèmics trasplantats a dia 1.

Els nivells d'expressió de TNF- α van augmentar de manera important després del trasplantament, amb els nivells màxims el dia 1, i després van disminuir el dia 3 i 7 tot i mantenint-se superiors als nivells presents en els illots frescos i els illots cultivats durant 24 h ($p = 0.002$) (Figura 23).

El primer dia després del trasplantament la hiperglucèmia feia augmentar els nivells d'expressió de TNF- α , moment en el qual es van detectar diferències significatives entre els grups normoglucèmic i hiperglucèmic ($p = 0.026$), tot i que aquesta diferència no es va mantenir significativa quan es va aplicar la correcció de Hochberg per a les comparacions múltiples. Els dies 3 i 7 l'expressió de TNF- α no era diferent entre els grups normoglucèmics i hiperglucèmics.

26.3. Expressió d'IL-6

No es va detectar la presència de mRNA de IL-6 en els illots frescos, en canvi, a les 24 h de cultiu sí que es va detectar IL-6 en el cicle 29.4 ± 0.4 de la PCR.

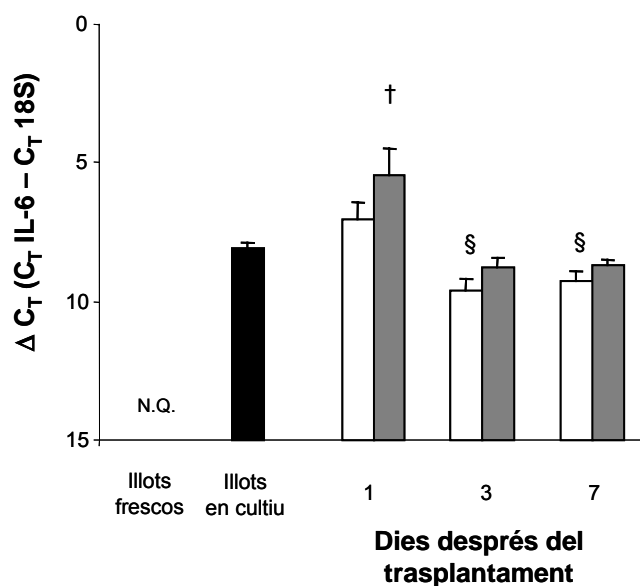


Figura 24. Expressió de la IL-6 en illots frescos, illots en cultiu i empelts ($n = 6$ per a cada grup experimental). Els valors s'expressen com a la mitjana \pm EEM de ΔC_T . Les barres negres representen els illots (frescos i en cultiu, tal com s'indica a la figura), les barres blanques corresponen als grups normoglucèmics i les grises als grups hiperglucèmics. N.Q.: No quantificable degut als baixos nivells d'expressió. Kruskal-Wallis, $p < 0.001$. *U* Mann-Whitney, † $p = 0.009$ vs. els illots en cultiu. § $p = 0.015$ vs. els illots en cultiu. En aplicar la correcció de Hochberg per a comparacions múltiples aquestes diferències no es van mantenir significatives tot i estar al límit de la significació.

El dia 1 després del trasplantament, l'expressió de IL-6 augmentava en el grup hiperglucèmic ($p = 0.009$). Aquesta diferència es va mantenir al límit de la significació quan s'ajustava per a

les comparacions múltiples amb la prova de Hochberg (0.054) (Figura 24). En els dies 3 i 7 després del trasplantament, l'expressió de IL-6 en els grups hiperglucèmic es mantenia igualment augmentada que en els illots cultivats. Per contra, en el grup normoglucèmic de dia 1 després del trasplantament IL-6 no estava augmentada respecte els illots en cultiu, i en els dies 3 i 7 després del trasplantament es trobava, fins i tot, per sota dels nivells dels illots cultivats ($p = 0.015$). Quan es va aplicar la correcció de Hochberg per a les comparacions múltiples, aquestes últimes diferències significatives ho van deixar de ser (resultat de Hochberg: 0.06).

26.4. Expressió d'IL-10

L'expressió de la IL-10 va ser molt baixa en totes les mostres de l'estudi ja que es detectava a cicles molt tardans de la PCR, i els augments que es van trobar, en comparació amb les altres citocines estudiades van ser inferiors. Tot i això, a excepció de les mostres d'illots frescos, la detecció de la IL-10 i la seva quantificació va ser possible. En els illots cultivats va aparèixer en el cicle 33.6 ± 0.4 de la PCR.

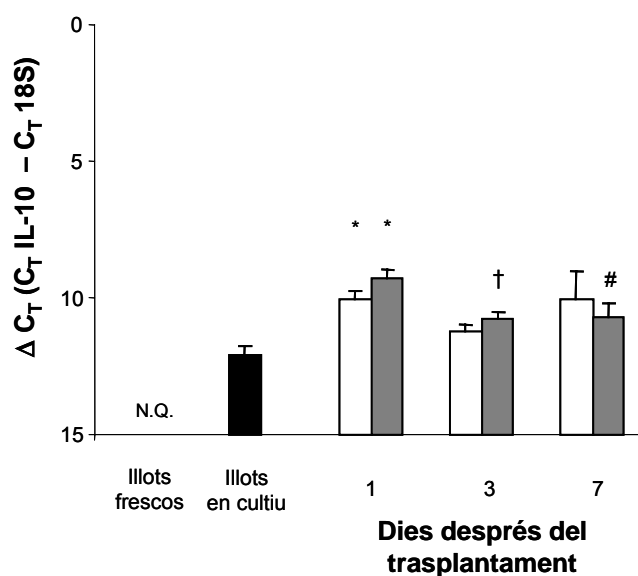


Figura 25. Expressió de la IL-10 en illots frescos, illots en cultiu i empelts ($n = 6$ per a cada grup experimental). Els valors s'expressen com a la mitjana \pm EEM de ΔC_T . Les barres negres representen els illots (frescos i en cultiu, tal com s'indica a la figura), les barres blanques corresponen als grups normoglucèmics i les grises als grups hiperglucèmics. N.Q.: No quantificable degut als baixos nivells d'expressió. Kruskal-Wallis, $p < 0.001$. *U* Mann-Whitney, * $p = 0.002$ vs. els illots en cultiu. † $p = 0.009$ vs. els illots en cultiu. # $p < 0.026$ vs. els illots en cultiu., aquesta última diferència no es va mantenir dins de la significació quan es va aplicar la correcció de Hochberg per a comparacions múltiples

Després del trasplantament els nivells d'expressió de IL-10 van augmentar ($p = 0.002$) en el dia 1 tant en el grup normoglucèmic com en el hiperglucèmic (Figura 25) i es va mantenir per sobre en el grup hiperglucèmic de dia 3. Aquestes diferències es van mantenir significatives

quan es va aplicar la correcció per a comparacions múltiples. Tot i que en el grup hiperglucèmic de dia 7 l'expressió de IL-10 es va mantenir alta respecte els illots en cultiu ($p = 0.026$), aquesta diferència no es va mantenir significativa després de la correcció de Hochberg. En els grups normoglucèmics de dies 3 i 7 després del trasplantament l'expressió de IL-10 es va mantenir als mateixos nivells que el dels illots en cultiu.

27. DETECCIÓ DE MACRÒFAGS, IL-1 β i iNOS EN L'EMPELT

Amb l'estudi de l'expressió de citocines es va mostrar l'augment de l'expressió del gen de la IL-1 β que es produeix després del trasplantament, així que es va fer l'estudi immunohistoquímic per veure si aquest augment es corresponia amb la presència de la proteïna en els empelts. Com és ben conegut que una de les vies a través de les quals actua la IL-1 β és la producció d'òxid nítric (NO) mitjançant la sintasa de l'òxid nítric induïble (iNOS), també es va analitzar la presència d'aquesta proteïna als empelts d'illots. També es va fer la tinció per a macròfags ja que es coneix que poden expressar la IL-1 β d'entre altres citocines. Així doncs, es van fer tincions per detectar la presència de macròfags, de IL-1 β i d'iNOS en empelts de rates Lewis normoglucèmiques després de 1, 3 i 7 dies del trasplantament.

27.1. Presència macròfags en l'empelt

En el pàncrees i immediatament després de l'aïllament es van detectar molt poques cèl·lules CD68 positives dins dels illots (Figura 26). En canvi, la presència de macròfags augmentava de manera molt important en els empelts, on eren visibles en gran quantitat en tots els temps d'estudi (1, 3 i 7 dies després del trasplantament). La major part d'aquests macròfags (cèl·lules positives per CD68), però, es localitzaven en la zona de la càpsula renal i envoltant el teixit insular, amb escasses cèl·lules d'aquest tipus dins del teixit insular.

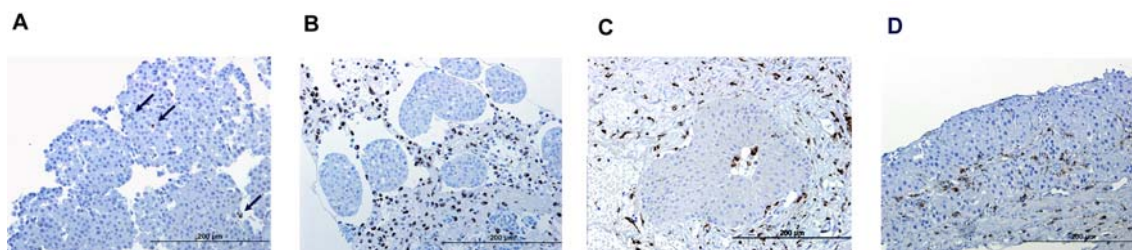


Figura 26. Tinció dels macròfags presents en els empelts. Visualització per microscòpia òptica. Marcatge per CD68 en illots frescos (A) i empelts d'illots de 1 (B), 3 (C) i 7 (D) dies després del trasplantament.

27.2. Presència de IL-1 β i iNOS en l'empelt

Es va detectar la presència de la proteïna de IL-1 β en empelts tant de 1 i 3 dies després del trasplantament (Figura 27). Per tal de determinar el paper dels macròfags en l'expressió de l'IL-1 β es va fer una doble tinció amb el marcador CD68.

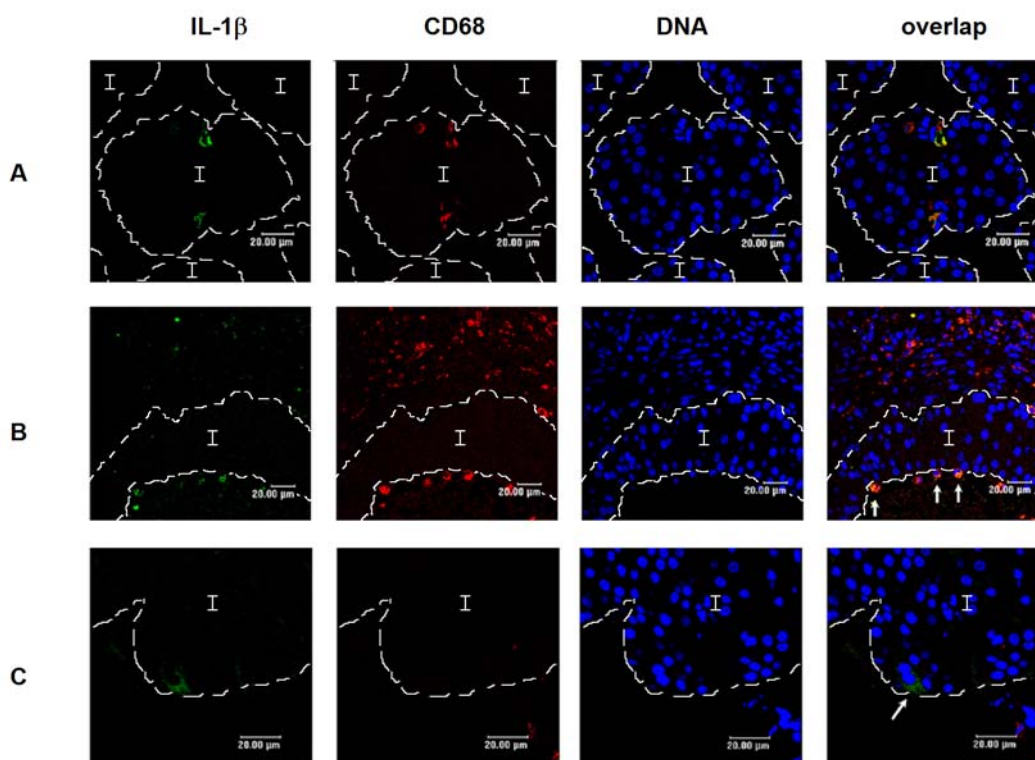


Figura 27. Presència d'IL-1 β en els empelts. Il·lots control: Il·lots tractats amb 50 ng/ml TNF- α + 750 U/ml IFN- γ + 10 μ g/ml LPS durant 4 h (A). La tinció de IL-1 β en els empelts es troba majoritàriament en els macròfags (cèl·lules positives per CD68) (B). En els empelts també es podia observar alguna cèl·lula positiva per IL-1 β que no corresponia amb cap cèl·lula marcada amb CD68 (C).

La major part (~95%) d'IL-1 β que apareixia en l'empelt colocalitzava amb cèl·lules positives per CD68, de manera que els macròfags serien els principals responsables de l'expressió de IL-1 β en l'empelt. El 10% (en els empelts de dia 1) i el 14% (en els empelts de dia 3) dels macròfags estaven expressant IL-1 β . En els empelts també apareixien algunes cèl·lules tenyides per IL-1 β que eren negatives per CD68, mostrant que d'altres tipus cel·lulars presents en l'empelt, a més a més dels macròfags, produeixen IL-1 β (Figura 27C). Aquestes cèl·lules IL-1 β -positives/CD68-negatives es localitzaven en la zona de teixit insular.

Resultats

També es va detectar la presència de cèl·lules marcades per iNOS en els empelts de 1 i 3 dies després del trasplantament (Figura 28). El 75% de les cèl·lules marcades per iNOS es corresponien amb el marcatge per CD68. En els empelts de dia 1, aproximadament el 35% dels macròfags expressaven iNOS i en els de dia 3 eren un 10%. Les cèl·lules iNOS-positives i CD68-negatives se situaven en zones de teixit insular, però també en zones de teixit necròtic i també en zones que no es corresponien a teixit insular.

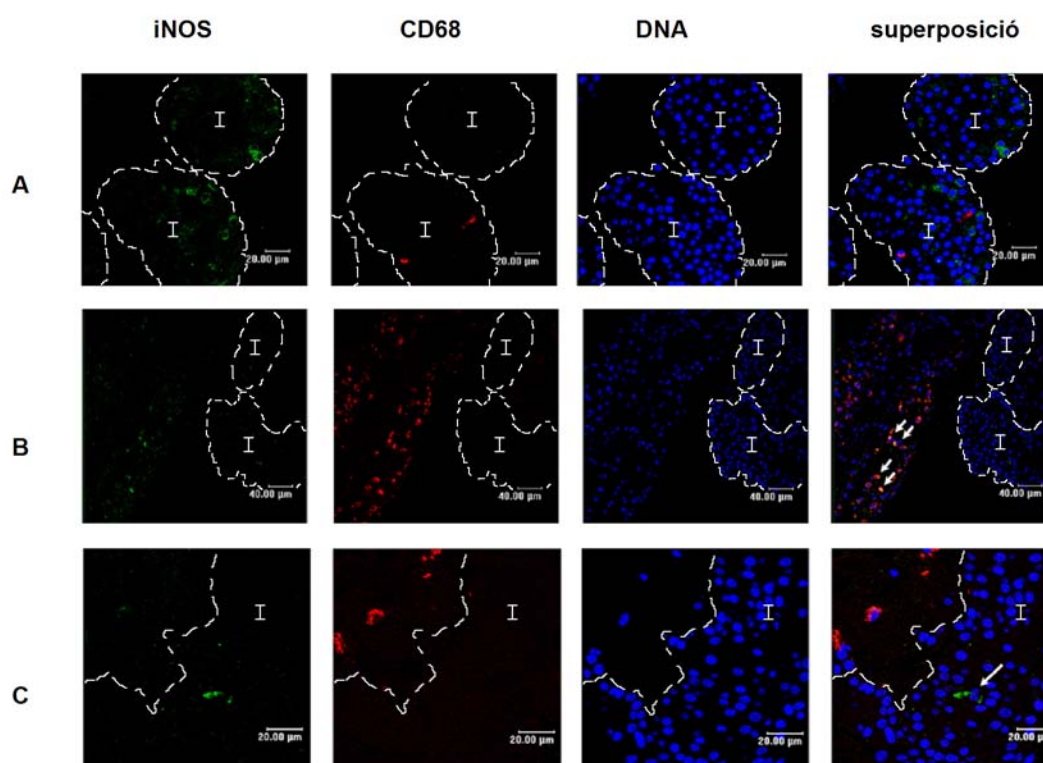


Figura 28. Presència d'iNOS en els empelts. Il·lotes control: Il·lotes tractats amb 50 U/ml IL-1 β durant 24 h (A). La tinció d'iNOS es troba principalment en cèl·lules CD68-positives (B). Tot i això també es van detectar cèl·lules positives per iNOS que no eren macròfags (C).

II. INHIBICIÓ DE L' APOPTOSI I TRASPLANTAMENT D'ILLOTS PANCREÀTICS

28. APOPTOSI DESPRÉS DE L'AÏLLAMENT DELS ILLOTS

Per a estudiar si el procés d'aïllament podria contribuir a l'apoptosi de les cèl·lules beta en el trasplantament, es van cultivar els illots de ratolí C57BL/6 durant diferents temps. En aquests illots es va determinar la mort cel·lular per apoptosi amb la tècnica del TUNEL.

La mort de les cèl·lules beta per apoptosi en els illots de ratolí immediatament després de l'aïllament va ser comparable a l'apoptosi de les cèl·lules beta en el pàncrees (pàncrees: $0.05 \pm 0.02\%$, illots frescos (0 h): $0.02 \pm 0.01\%$). A les 24 h de cultiu es va produir un augment de l'apoptosi de 8 vegades respecte la dels illots frescos ($0.16 \pm 0.04\%$, $p < 0.001$) (Figura 29). Després d'aquest augment inicial, l'apoptosi va disminuir a les 48 h, assolint pràcticament els mateixos nivells que en el pàncrees, per tornar a augmentar progressivament en els dies següents i es va estabilitzar a partir de les 96 h de cultiu.

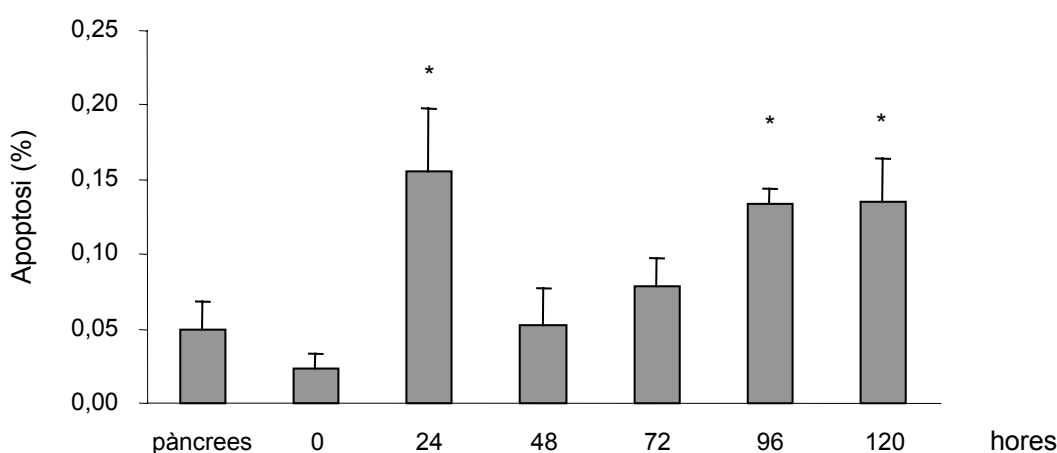


Figura 29. Apoptosi en els illots del pàncrees de ratolí C57BL/6 i en illots aïllats. L'apoptosi es va determinar en els illots immediatament després de l'aïllament (0 h) ($n = 15$), a les 24 h ($n = 8$), 48 h ($n = 7$), 72 h ($n = 8$), 96 h ($n = 5$) i 120 h ($n = 10$) de cultiu. L'apoptosi va ser mesurada per la tècnica del TUNEL i s'expressa com a percentatge de cèl·lules apoptòtiques vs. el total de cèl·lules de l'illot. Els resultats són la mitjana \pm EEM. ANOVA, $p < 0.005$; Fisher, * $p < 0.01$ vs. 0 hores després aïllament.

29. INHIBICIÓ DE L'APOPTOSI EN ELS ILLOTS *IN VITRO*

29.1. Cultiu dels illots amb citocines i z-VAD.fmk

És ben conegut que les citocines produeixen un augment de la mort per apoptosi en els illots de ratolí. Per a comprovar la funcionalitat de l'inhibidor de les caspases z-VAD.fmk es va usar una barreja de citocines per augmentar l'apoptosi dels illots en cultiu i poder observar l'efecte de l'inhibidor de les caspases. Els illots es van deixar durant 48 h en cultiu amb medi estàndard per tal d'evitar l'augment d'apoptosi inicial que es produeix a les 24 h que s'havia pogut detectar en els experiments previs (Figura 29) i que ens podria donar uns valors basals d'apoptosi elevats. A les 48 h l'apoptosi tornava a ser pràcticament la mateixa que en pàncrees i va ser en aquest moment quan es va començar la incubació amb l'inhibidor de les caspases z-VAD.fmk 100 μ M durant 2 h. Després d'aquestes 2 h es va fer la incubació amb la barreja de citocines (IL-1 β 50 U/ml, TNF- α 1000 U/ml i IFN- γ 1000 U/ml) durant 48 h o 72 h.

El cultiu amb les citocines va induir canvis morfològics en els illots. Mentre que els illots control presentaven una forma compacta i arrodonida, els illots que havien estat cultivats amb les citocines eren molt més petits i en el medi es podia observar una gran quantitat de cèl·lules mortes. Els illots que havien estat preincubats amb l'inhibidor de les caspases i la barreja de citocines presentaven un millor aspecte que els que només havien estat incubats amb la barreja de citocines (Figura 30).

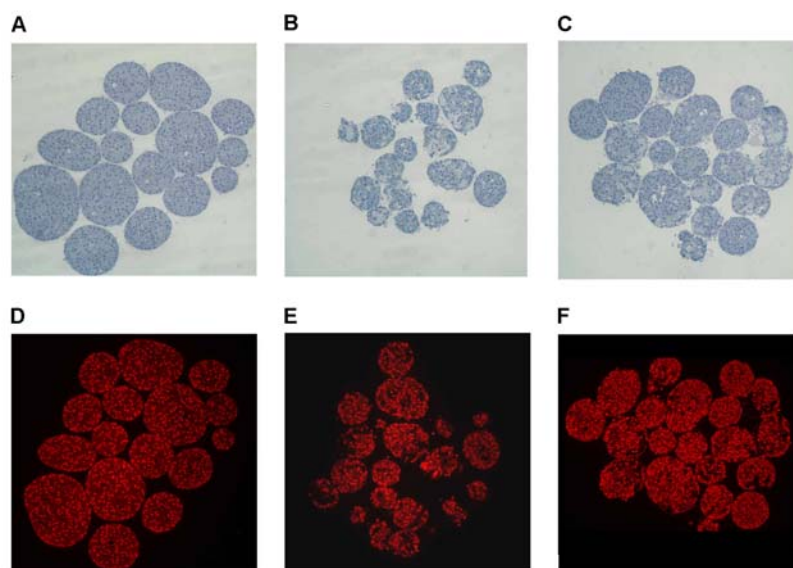


Figura 30. Aspecte dels illots control (A i D), tractats amb citocines (B i E) i preincubats amb z-VAD.fmk 100 μ M durant 2 h abans del tractament amb les citocines (C i F). Les peces es van tenyir per TUNEL (A, B i C) i per iodur de propidi (IP) (D, E i F). Augments: 20 \times

29.1.1. Apoptosi dels illots tractats amb citocines i z-VAD.fmk

Degut a que 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 vam voler comprovar els resultats obtinguts utilitzant una altra tècnica, la tinció per iodur de propidi (IP), amb la qual els nuclis apoptòtics es distingeixen fàcilment perquè estan condensats i són més brillants (Figura 30). La similitud dels valors obtinguts amb les dues tècniques de mesura de l'apoptosi (Taula 4) van confirmar els resultats obtinguts i en els estudis posteriors les mesures d'apoptosi es van fer únicament per la tècnica de TUNEL.

Taula 4. Comprovació dels resultats d'apoptosi per dues tècniques: TUNEL i IP

	Apoptosi (TUNEL)	Apoptosi (IP)
Control	0.08 ± 0.03% (n = 6)	0.11 ± 0.05% (n = 6)
CK (IL-1β + TNF-α + IFN-γ)	0.77 ± 0.11% (n = 7)*	0.92 ± 0.14% (n = 6)**
z-VAD.fmk + CK	0.30 ± 0.04% (n = 7)	0.37 ± 0.06% (n = 7)

Control: illots cultivats durant 48 h amb medi estàndard. CK: illots cultivats durant 48 h amb la barreja de citocines. z-VAD.fmk + CK: illots tractats durant 2 h amb z-VAD.fmk 100 μM i després amb la barreja de citocines durant 48 h. Els valors són la mitjana ± EEM. *Mann-Wihtney $p < 0.005$ entre CK i control i z-VAD.fmk + CK. **Fisher $p < 0.001$ entre CK i control i z-VAD.fmk + CK.

En la figura 31 es poden veure els resultats d'apoptosi mesurats amb la tècnica del TUNEL en els illots tractats amb citocines. La incubació durant 48 h amb barreja de citocines va produir un augment de l'apoptosi d'unes 8 vegades quan es van comparar amb l'apoptosi dels illots control (citocines: 0.77 ± 0.11%, control: 0.09 ± 0.03%, $p < 0.005$). La incubació amb les citocines durant 72 h encara va fer que l'apoptosi de les cèl·lules beta augmentés més, unes 11 vegades (citocines: 2.51 ± 0.41%, control: 0.22 ± 0.05%, $p < 0.02$). La preincubació amb z-VAD.fmk 100 μM durant 2 h va reduir en un 61% l'apoptosi produïda per 48 h de tractament amb les citocines (0.3 ± 0.04%, $p < 0.002$) i en un 35% quan el tractament amb les citocines es va allargar fins les 72 h (1.63 ± 0.72), tot i no arribar a ser estadísticament significativa (Figura 31).

Resultats

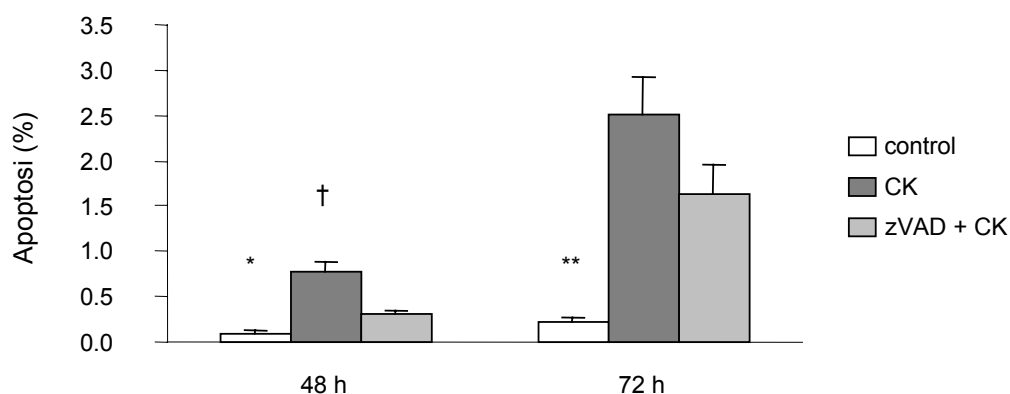


Figura 31. Apoptosi en els illots cultivats amb citocines durant 48 h o 72 h mesurada amb la tècnica del TUNEL. Tots els illots van ser precultivats durant 48 h o 72 h abans de començar l'experiment. Control: illots cultivats amb medi estàndard durant 48 h (n = 6) o 72 h (n = 4). CK: illots cultivats amb la barreja de citocines durant 48 h (n = 7) o 72 h (n = 4). zVAD + CK: illots preincubats durant 2 h amb z-VAD.fmk 100 μ M i després cultivats amb la barreja de citocines durant 48 h (n = 7) o 72 h (n = 5). Els valors són la mitjana \pm EEM. Kruskal-Wallis, $p < 0.02$; Mann-Whitney, * $p < 0.005$ vs. CK i zVAD + CK. † $p < 0.005$ vs. zVAD + CK. ** $p < 0.05$ vs. CK i zVAD + CK.

29.1.2. Contingut d'insulina i DNA en els illots tractats amb citocines i z-VAD.fmk

El contingut d'insulina dels illots després de 48 h de cultiu amb la barreja de citocines es trobava reduït en un 54% en comparació amb els illots control (Taula 5). La preincubació amb l'inhibidor de les caspases no va fer que es recuperés totalment el contingut d'insulina tot que la reducció del contingut d'insulina era menor (37%).

Taula 5. Contingut d'insulina i de DNA d'illots cultivats durant 48 h amb citocines.

	n	contingut d'insulina (ng/10 illots)	contingut de DNA (ng/10 illots)	insulina/DNA (ng/ng)
Control	10	265 \pm 24*	179 \pm 19 [†]	1.55 \pm 0.14
CK (IL-1 β + TNF- α + IFN- γ)	10	121 \pm 20	101 \pm 12	1.21 \pm 0.21
z-VAD.fmk + CK	10	166 \pm 29	128 \pm 19	1.48 \pm 0.28

Control: illots cultivats durant 48 h amb medi estàndard. CK: illots cultivats durant 48 h amb la barreja de citocines. z-VAD.fmk + CK: illots tractats durant 2 h amb z-VAD.fmk 100 μ M i després amb la barreja de citocines durant 48 h. Els valors són la mitjana \pm EEM. ANOVA $p < 0.02$. * $p < 0.05$ per control vs. CK i z-VAD.fmk + CK.

Tenint en compte que el contingut de DNA d'una cèl·lula és fixe, es va prendre el contingut de DNA com a reflex del nombre de cèl·lules de les mostres i es va usar per normalitzar el

contingut d'insulina. Es va poder observar que la incubació dels illots amb citocines va fer disminuir un 44% el contingut de DNA respecte el que presentaven els illots control. En els illots preincubats amb l'inhibidor de les caspases aquesta reducció respecte els illots control va ser del 28.5%. En corregir els valors de contingut d'insulina amb el contingut de DNA de les mostres es va veure que mentre que en els illots tractats amb les citocines la disminució del contingut d'insulina respecte els illots control era d'un 22%, en els illots preincubats amb el z-VAD.fmk la reducció del contingut només era d'un 4.5%, tot i que no es van trobar diferències significatives entre els dos grups.

30. INHIBICIÓ DE L'APOPTOSI EN EL TRASPLANTAMENT D'ILLOTS

30.1. Dosi de z-VAD.fmk necessària per reduir l'apoptosi en el trasplantament d'illots

Quan ja s'havia determinat que amb una preincubació de només 2 hores el z-VAD.fmk era capaç de reduir l'apoptosi en illots de ratolí *in vitro*, es va estudiar l'efecte *in vivo* en el trasplantament d'illots singènics. Per comprovar quina dosi de l'inhibidor era efectiva en el model *in vivo* es van incubar grups de 150 illots durant 2 hores amb diferents dosis de z-VAD.fmk, es van trasplantar i es va recuperar l'empelt el dia 3 després del trasplantament. L'apoptosi de les cèl·lules beta dels illots control trasplantats va augmentar més de cinc vegades ($0.28 \pm 0.03\%$) en comparació a la dels illots immediatament després de l'aïllament ($0.08 \pm 0.02\%$) i la dels illots en el pàncrees ($0.05 \pm 0.02\%$) ($p < 0.02$) (Figura 32). L'apoptosi de les cèl·lules beta dels empelts d'illots preincubats amb z-VAD.fmk $100 \mu\text{M}$ es va mantenir igualment elevada ($0.34 \pm 0.08\%$; $p < 0.05$). En canvi, quan els illots havien estat preincubats amb una concentració final de z-VAD.fmk de $200 \mu\text{M}$ o $500 \mu\text{M}$, l'apoptosi es va reduir en un 50% ($0.14 \pm 0.02\%$) i en un 39.3% ($0.17 \pm 0.01\%$) ($p < 0.02$), respectivament.

Les dosis de z-VAD.fmk que van ser efectives reduint l'apoptosi ($200 \mu\text{M}$ i $500 \mu\text{M}$) 3 dies després del trasplantament són les que es van usar per els estudis posteriors de l'evolució de l'empelt

Resultats

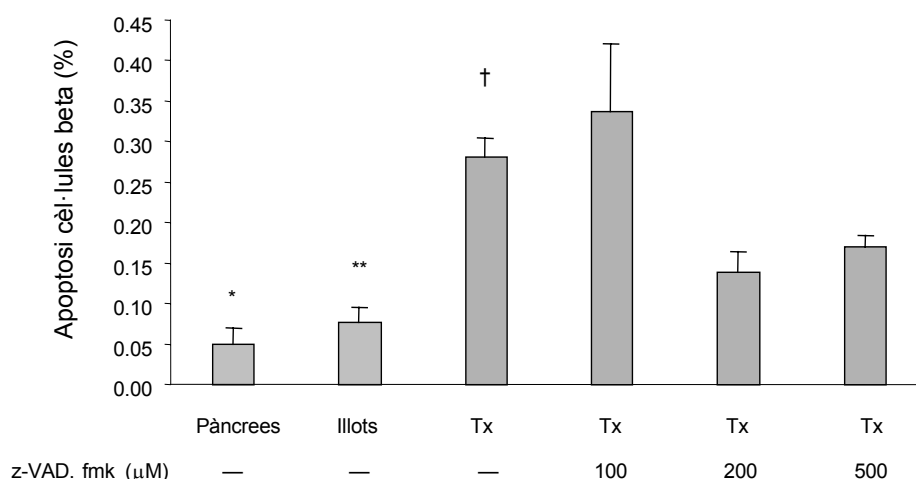
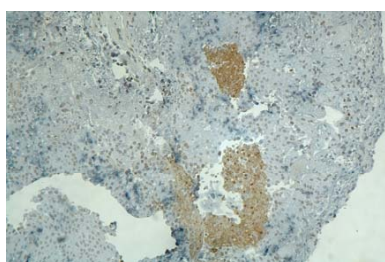


Figura 32. Apoptosi de les cèl·lules beta en pàncrees (n = 8), illots frescos (n = 7) i illots trasplantats durant 3 dies a ratolins C57BL/6. Els illots trasplantats (Tx) es van preincubar durant 2 h sense z-VAD.fmk (control, n = 9) o amb z-VAD.fmk 100 μM (n = 3), 200 μM (n = 6) o 500 μM (n = 6). L'apoptosi es va mesurar per la tècnica del TUNEL i s'expressa com a nuclis apoptòtics sobre el total de cèl·lules beta. Els valors són la mitjana ± EEM. Kruskal-Wallis: $p < 0.001$; Mann-Whitney: * $p < 0.05$ amb tots els grups d'illots trasplantats; ** $p < 0.02$ amb illots trasplantats control, z-VAD.fmk 100 μM i 500 μM; † $p < 0.02$ amb pàncrees, illots frescos i illots trasplantats z-VAD.fmk 200 μM i 500 μM.

30.2. Necrosi

També es va fer l'estudi del percentatge de l'àrea insular necròtica en les peces d'empelts de 3 dies. El dia tres després del trasplantament es van observar importants àrees necròtiques en la zona central del teixit endocrí (Figura 33), que no es van modificar amb la inhibició de les caspases (control: $22.7 \pm 8.4\%$; z-VAD.fmk 200 μM: $27.8 \pm 10.7\%$; z-VAD.fmk 500 μM: $17.5 \pm 6.1\%$), indicant que la reducció de l'apoptosi no resultava en un augment de la necrosi.

A



B

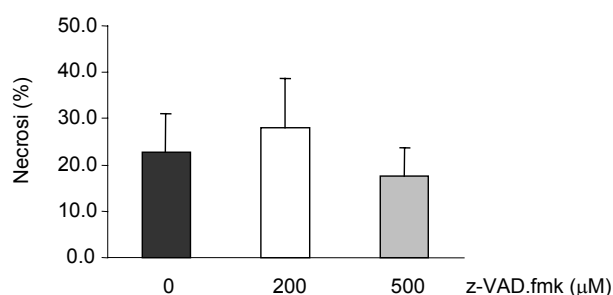


Figura 33. Necrosi en els empelts extrets 3 dies després del trasplantament. A. Fragment d'un empelt de 3 dies corresponent al grup control tenyit per la tècnica del TUNEL i amb un cocktail d'anticossos per a les cèl·lules no beta de l'illot. A 20x augments es poden observar fàcilment les àrees necròtiques insulars tenyides de marró. B. Percentatge de necrosi insular mesurada en els empelts de 3 dies per morfometria de punts. Els resultats són els corresponents als grups de ratolins C57BL/6 diabètics trasplantats amb 150 illots singènics que havien estat preincubats durant 2 h sense z-VAD.fmk (control, n = 7) o amb z-VAD.fmk 200 μM (n = 5) o 500 μM (n = 6). Els valors són la mitjana ± EEM.

30.3. Efecte de la inhibició de les caspases en l'evolució del trasplantament d'illots

Es van trasplantar ratolins diabètics per estreptozotocina amb una massa de cèl·lules beta marginal (150 illots), per a comprovar la hipòtesi que la reducció de l'apoptosi inicial podria millorar l'evolució metabòlica dels animals trasplantats.

30.3.1. Evolució metabòlica dels animals trasplantats

Als ratolins trasplantats amb 150 illots se'l va fer el seguiment metabòlic (mesures de glucèmia i pes) durant 4 setmanes. Abans del trasplantament es van incubar els illots durant 2 h amb una concentració final de z-VAD.fmk 200 μ M i 500 μ M (les concentracions que havíem vist que reduïen l'apoptosi) o bé amb DMSO al 0.05% (grup control). La massa beta trasplantada corresponent a 150 illots és una massa marginal i s'esperava que els animals es mantinguessin hiperglucèmics durant tot l'estudi.

Tots els animals presentaven uns valors de glucosa en sang i uns pesos comparables quan es van injectar amb l'estreptozotocina (180 mg/kg de pes). Un 74.7% dels ratolins injectats van complir les condicions d'hiperglucèmia (>20 mmol/l en dues mesures consecutives), poliúria i pèrdua de pes després de la injecció amb l'estreptozotocina. En el moment del trasplantament els nivells de glucosa dels tres grups també van ser comparables (Taula 6).

Taula 6. Característiques dels grups experimentals

Tractament	n	Dia injecció STZ		Dia del trasplantament		Dia de l'extracció (28 d després del trasplantament)	
		Glucèmia (mmol/l)	Pes (g)	Glucèmia (mmol/l)	Pes (g)	Glucèmia (mmol/l)	Pes (g)
Control	15	6.9 \pm 0.2	25.0 \pm 0.2	31.0 \pm 0.9	23.3 \pm 0.4	22.8 \pm 3.0	24.5 \pm 0.6
z-VAD.fmk 200 μ M	10	6.8 \pm 0.5	24.8 \pm 0.3	33.0 \pm 0.2	23.0 \pm 0.6	22.6 \pm 3.9	25.0 \pm 0.5
z-VAD.fmk 500 μ M	7	7.1 \pm 0.4	24.7 \pm 0.2	32.5 \pm 0.5	23.4 \pm 0.3	15.7 \pm 3.6	25.7 \pm 0.5

Després del trasplantament els grups control i z-VAD.fmk 200 μ M van tenir una evolució metabòlica (pes i glucèmia) similar (Figura 34). En canvi, el grup z-VAD.fmk 500 μ M de ratolins trasplantats presentava uns nivells de glucosa en sang inferiors als altres dos grups a partir del dia 7 després del trasplantament. És a partir d'aquest moment quan la corba de pesos dels animals d'aquest grup també es comença a separar de la dels altres dos grups.

Resultats

El criteri per acceptar que un animal s'havia curat va ser que presentés uns nivells de glucosa en sang inferiors a la mitjana de glucoses de tots els animals inclosos en l'estudi just abans de la injecció amb l'estreptozotocina ($n = 52$) + dues vegades la desviació estàndard, això és, valors de glucosa en sang <8.9 mmol/l. A més, aquests animals havien de retornar a la hiperglucèmia quan se'ls extragués l'empelt (mesura de glucosa 4 dies després de l'extracció de l'empelt) per poder confirmar que havien estat els illots trasplantats els responsables de mantenir la normoglucèmia, condició que es va complir en tots els animals que seguien el criteri de curació basant en la glucosa.

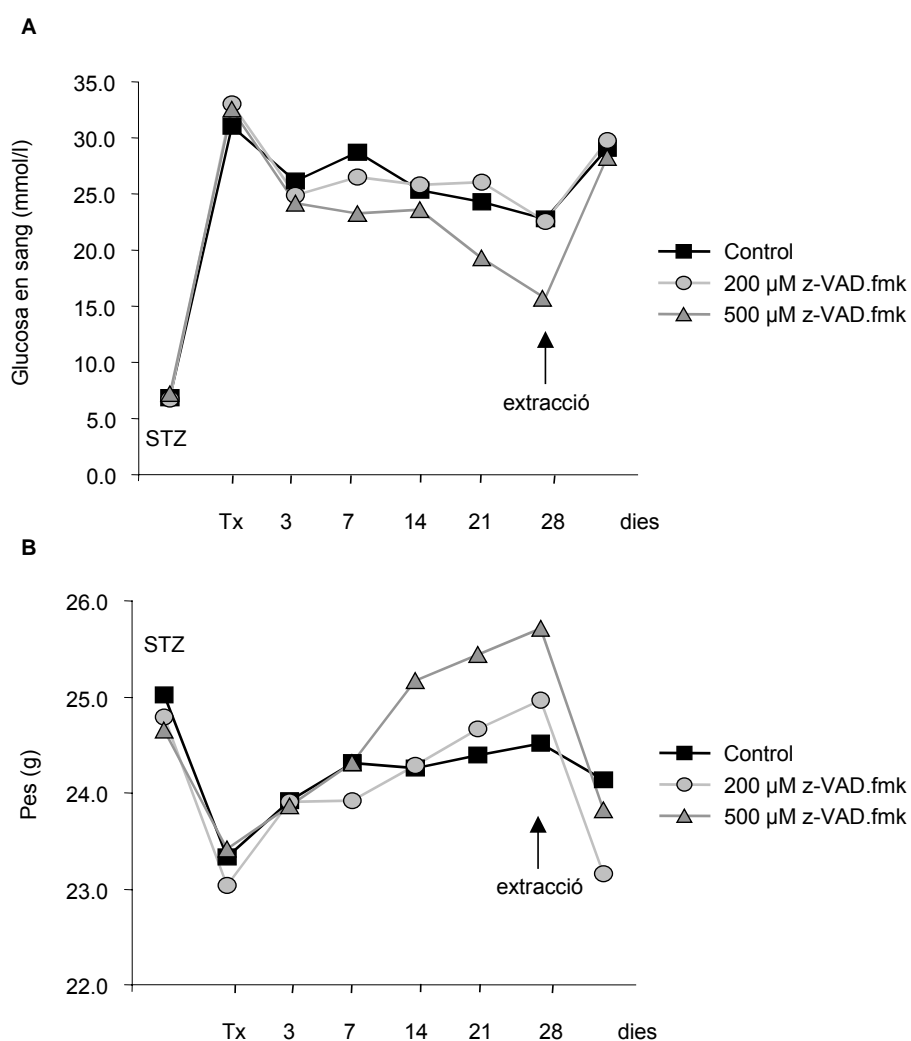


Figura 34. Evolució metabòlica dels animals trasplantats. A. Glucèmia. B. Pesos. STZ: injecció d'estreptozotocina. Tx: dia del trasplantament amb 150 illots singènics incubats durant 2 h en medi estàndard (control) o bé amb l'inhibidor de les caspases z-VAD.fmk 200 µM o 500 µM.

Tenint en compte aquest estricte criteri de curació un 27% (4 de 15) dels animals del grup control trasplantats es van curar. Amb el trasplantament dels illots incubats amb una concentració de 200 μM de z-VAD.fmk no es va observar cap millora respecte a la curació i un 30% (3 de 10) dels animals d'aquest grup es van curar. Un dels animals curats pertanyent a aquest grup d'animals va morir en el moment de l'extracció de l'empelt i no es va poder fer la mesura de la glucèmia post-extracció. A aquest animal se li va extreure el pàncrees, es va fixar en PFA 4% i es va incloure en parafina. Es va fer una tinció del pàncrees amb insulina i es va comprovar que no hi quedaven pràcticament cèl·lules beta en el pàncrees, indicant que havien estat els illots trasplantats els responsables de la normoglicèmia i, per tant, l'animal s'havia curat degut al trasplantament. Quan els illots es van tractar abans del trasplantament amb una concentració de l'inhibidor superior, 500 μM de z-VAD.fmk, es van curar un 43% dels receptors (3 de 7).

Quan es va analitzar l'evolució de la glucosa des del dia 3 després del trasplantament fins el dia de l'extracció de l'empelt, es van observar diferències entre els tres grups estudiats (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$), amb uns valors inferiors en els animals trasplantats amb els illots preincubats amb z-VAD.fmk 500 μM (21.2 ± 1.5 mmol/l), que en el grup control (25.3 ± 1.1 mmol/l, Mann-Whitney, $p < 0.001$) o que en el grup d'animals trasplantats amb illots preincubats amb z-VAD.fmk 200 μM (25.2 ± 1.2 mmol/l, Mann-Whitney, $p < 0.05$). El dia de l'extracció de l'empelt (28 dies post-trasplantament), els valors de glucosa del grup d'animals trasplantats amb els illots preincubats amb z-VAD.fmk 500 μM (15.7 ± 3.6 mmol/l) eren inferiors que els del dia del trasplantament (32.5 ± 0.5 mmol/l, Mann-Whitney, $p < 0.005$), mentre que no es van detectar diferències significatives entre el grup control (22.8 ± 3.0 mmol/l *versus* 31.0 ± 0.9 mmol/l) i el d'animals trasplantats amb illots preincubats amb z-VAD.fmk 200 μM (22.6 ± 3.9 mmol/l *versus* 32.9 ± 0.2 mmol/l).

30.3.2. Evolució de la massa beta trasplantada

La massa beta en els illots trasplantats, preincubats durant 2 h en medi control o bé amb 200 μM o 500 μM de z-VAD.fmk, es va determinar els dies 3 i 28 després del trasplantament. La massa beta inicialment trasplantada, que es va mesurar en grups de 150 illots immediatament després de l'aïllament (0.29 ± 0.02 mg) estava reduïda de manera similar en els tres grups el dia tres després del trasplantament, control: 0.10 ± 0.02 mg, z-VAD.fmk 200 μM : 0.07 ± 0.01 mg i z-VAD.fmk 500 μM : 0.09 ± 0.01 mg ($p < 0.001$) (Figura 35).

Resultats

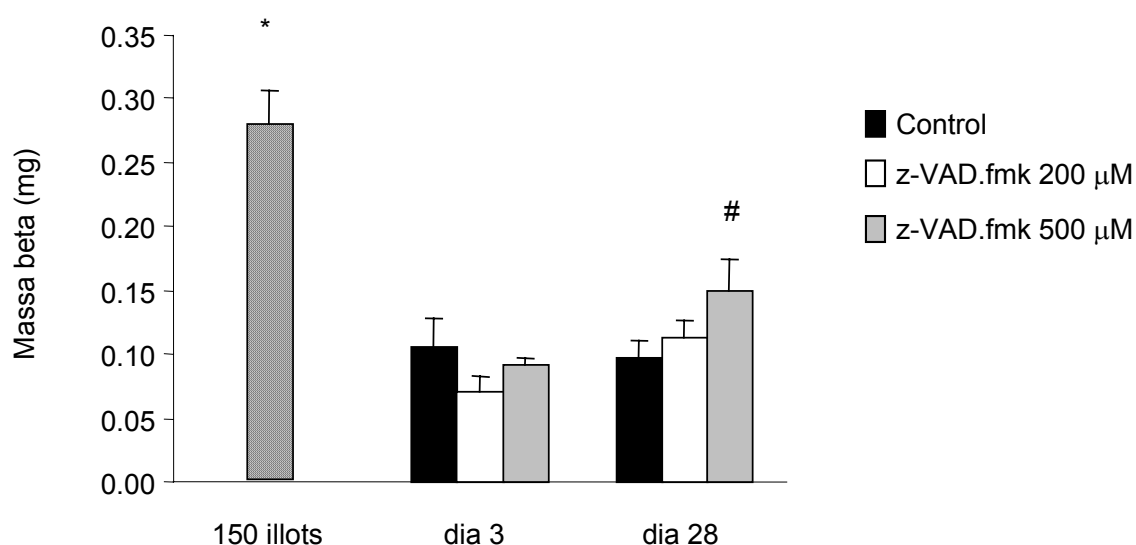


Figura 35. Massa beta en grups de 150 illots frescos (n = 10) i en els empelts de 150 illots trasplantats a ratolins C57BL/6 diabètics per estreptozotocina 3 i 28 dies després del trasplantament. Els illots trasplantats (Tx) es van preincubar durant 2 h sense z-VAD.fmk (control, dia 3: n = 7, dia 28: n = 13) o amb z-VAD.fmk 200 µM (dia 3: n = 5, dia 28: n = 10) o 500 µM (dia 3: n = 6, dia 28: n = 7). Els valors són la mitjana ± EMM. ANOVA, $p < 0.001$. Fisher: * $p < 0.001$ entre els 150 illots frescos i la resta de grups. # $p < 0.05$ entre el grup control i el grup z-VAD.fmk 500 µM en el dia 28 després del trasplantament.

Per contra, quan es mesurava la massa a grups de 150 illots que havien estat en cultiu en un medi estàndard per al cultiu dels illots de ratolí durant 3 dies no es produïa una reducció de la massa dels 150 illots (0.27 ± 0.04 mg), indicant que la reducció de la massa beta en els empelts de 3 dies era deguda al trasplantament. Tot i que el dia 28 després del trasplantament la massa beta es mantenia reduïda en els tres grups, els empelts dels animals trasplantats amb illots preincubats amb z-VAD.fmk 500 µM presentaren un augment significatiu de la massa beta respecte el grup control (control: 0.10 ± 0.02 mg; z-VAD.fmk 500 µM: 0.15 ± 0.02 mg; $p < 0.05$). Aquest augment de la massa beta trasplantada en els empelts d'illots que havien estat preincubats amb 500 µM de z-VAD.fmk respecte els control coincidia amb la millor evolució de la glucosa en aquest grup, mostrant la importància de reduir l'apoptosi inicial en els illots trasplantats, i l'important paper que té aquesta mort inicial en l'evolució de l'empelt.