



Universitat Autònoma de Barcelona

FACULTAT DE VETERINÀRIA

**CENTRE DE BIOTECNOLOGIA ANIMAL
I TERÀPIA GÈNICA (CBATEG)**

**ESTUDI DEL PAPER DELS FACTORS DE
CREIXEMENT IGF-I I VEGF EN LA
REGENERACIÓ I LA FUNCIONALITAT DEL
PÀNCREES ENDOCRÍ**

JUDITH AGUDO i CANTERO

Memòria presentada per la llicenciada JUDITH AGUDO CANTERO per optar al grau de Doctor en Bioquímica.

Aquesta Tesi Doctoral ha estat realitzada sota la direcció de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Veterinària i en el Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG).

JUDITH AGUDO i CANTERO

FÀTIMA BOSCH i TUBERT

Febrer del 2008

BELLATERRA

A tu, mare, per donar-ho tot per nosaltres, per creure en mi.

A tu, Albert, per ser l'estrella que més brilla, el meu centre de gravetat. T'estimo.

AGRAÏMENTS

Quan una Tesi Doctoral finalitza, una persona es doctora, no obstant, una Tesi Doctoral no és mai el treball d'una única persona...així doncs, hi ha molt per agrair...

En primer lloc, voldria donar les gràcies a la Dra. Fàtima Bosch per acollir-me en el seu grup, i haver-me donat l'oportunitat de realitzar aquesta Tesi Doctoral. Gràcies per la confiança dispostada en mi, però sobretot per contagiar-me el seu entusiasme i energia.

Les gràcies més especials són per les persones que han estat amb mi dia a dia, "lluïtant" per aquesta Tesi: Gràcies, Ari, per ser la meva eterna companya en els tests, extraccions d'illots i westerns i, en moltes "aventures" fora del laboratori, per ser una amiga. Gracias, Marta por el trabajo bien hecho, y tu infinita paciencia y, gracias por los conciertos! També he de donar les gràcies a l'Edu, per ajudar-me i ensenyar-me en els meus primers passos en el món dels "transgènics de pàncrees", gràcies per creure en mi. Gracias, Vero, por tu increíble capacidad de trabajo y por ser como eres, auténtica, no cambies nunca! I, gràcies, sobretot, a l'Alba, per ser un exemple a seguir, no només com a científica, sinó, sobretot, com a persona, gràcies per escoltar-me i aconsellar-me.

Aquest treball no hauria estat possible sense la feina de la Unitat d'Animals Transgènics, que va generar els animals. Gràcies a la Dra. Anna Pujol, cap de la unitat i, al seu equip, l'Anna Arbós, L'Ainara i la Sandra. Gràcies pels animals, però també pels somriures de bon matí i les rialles!. A més, tampoc hagués estat possible sense el servei d'estabulari (SER) que va tenir cura dels animals. Gracias, Dr Pedro Otaegi, por dirigir este servicio, por tu interés y por las discusiones científicas. Gràcies, Mire, per la teva feina amb els animals, gràcies per ser tan especial i carinyosa.

Gràcies a la Dra. Tura Ferré com a cap de la Unitat de metabolisme, gràcies pels kits, les determinacions i, Tura, gràcies per tantes coses!...que no tindria prou paper per explicar-les! També gràcies al Miquel per l'ajut amb la Real-time, el Luminex, pels seus bons consells, i per ser molt més sociable del que fas creure! Gracias, Sabrina, por manejar el FACS y responsabilizarte del trabajo como si fuera tuyo, por muchas sonrisas.

Gràcies a la "cuina", sense les solucions i reactius sempre a punt, aquest treball hauria estat molt difícil. Gracias Jenny y Lidia, por vuestro trabajo y simpatia. Gràcies a la Maria, per ser una "maga" de la biologia molecular i, sobretot, per ser tan alegre i estar disposada sempre a ajudar. I, gràcies al

Xavi León, el fabricant de virus! A més, encara que no formen part d'aquesta cuina, també he de donar les gràcies als que hi van estar en aquesta o a altres "cuines"...al Carles Ros per ser sempre molt més que un tècnic i a l'Anna Vilalta, gràcies per la seva ajuda, per ser tan atenta.

A l'equip de la Unitat de Morfologia. Gracias, Dr Jesus Ruberte, por un trabajo meticulado, por estar dispuesto a ayudar. També al David per la seva inestimable ajuda amb el confocal i, a la Vero i a la resta de gent del grup, moltes gràcies pel seu interès i el seu suport.

Al l'administració del CBATEG, per la feina amb la "paperassa", per fer possible la nostra feina. Sobretot, gràcies a la Montse Bellido.

A l'Albert Ruzo, pel disseny de primers, d'esquemes, l'ajut amb els càlculs de les Q-PCRs i per mil coses...Al Carles Roca, pel seu ajut en el laboratori milers de vegades, per estar sempre disposat a escoltar i, per la música! A la Ivet, per compartir l'"aventura" de treballar amb VEGF, pels ELISEs i PCRs, gràcies per ser tan dolça. A la Vicky, empezamos juntas un camino largo, lleno de momentos buenos y no tan buenos, gracias por compartirlos, por ser una enciclopedia y gracias por el viaje de mi vida, Argentina es todo lo que decías y, más!. Al Xavi Martínez, per fer-me les preguntes més intel·ligents, per la teva sinceritat en molts aspectes, ha estat un honor tornar-te a trobar aquí. Al Sergio, por tu ayuda hasta altas horas en el lab, por compartir secretos y confesiones. Gracias, Sylvie, por tus críticas sobre los resultados y, sobretodo, por tus consejos sobre la vida, por tu amistad. A Chris, gracias por tu ayuda con el inglés, por los –hola, ju, qué tal? por escucharme, aunque no sé si también entenderme! A Pilar, por las peleas con los westerns, por saber estar, eres un encanto!. Al David, per preocupar-te tant de tothom, per fer-me sentir bé en moments baixos. A l'Albert Ribera, per donar un cop de mà quan cal i, per la teva simpatia. Als que ja no hi són, Joel, Antonio, Àlex, pels bons moments compartits, per confesions, estressos, nervis i satisfaccions, tot el que implica una Tesi. Gràcies a la Mónica, pels seus experiments, que van servir de punt de partida per una part d'aquest Tesi. I gràcies al Dr. Malcolm Watford, per ensenyar-me les primeres determinacions i sempre amb molta amabilitat. També gràcies als que hi han estat poc, però que m'ha agradat conèixer: a Luca, Marisa, Gor, Antonella i Edu. I gràcies als que han tornat, gràcies Efrén, pel punt de vista dels que ja han viscut.

A la gent de la 5^a pel seu companyarisme, sobretot als inicis. En especial a la Mercè Monfar per les seves ensenyances amb una gran paciència. També a la Maria Ontiveros, per l'ajuda quan formaves part del nostre grup i per moltes converses i moments. Gràcies també als Drs. Miguel Chillón y Assumpció Bosch.

Als del passadís de Bioquímica pel temps i moments compartits mentre estàvem a Veterinària: Ivan, Ernesto, Amparo, Raquel, Asier..., gràcies pel recolzament al lab a hores “intempestives” i pels sopars! Gràcies als Drs. Joaquim Ariño, Anna Bassols, Néstor Gómez i Anna Barceló.

Als meus amics, que sempre m’han animat i aguantat en moments durs. Sobretot, gràcies, Aleix, sé que t’hagués agradat molt estar aquí ara. Als meus germans, gràcies Miriam i Noé, per estimar-me. Al meu avi, gràcies per cuidar de nosaltres, estaries orgullós de mi! A la meva mare, per animar-me i encoratjar-me. Per ser la persona més valenta i forta del món. A l’Albert, no tinc paraules per agrair-t’ho tot, així que senzillament, gràcies!

Aquest treball ha estat possible gràcies en primer lloc a la beca predoctoral del Ministeri FPU, finançada pel Ministerio de Educación, Cultura y Deportes, de la que he estat beneficiària durant quatre anys. Les investigacions s’han realitzat també gràcies a la financiació rebuda del Instituto de Salud Carlos III (Red de Centros Metabolismo y Nutrición C03/08, Red de Grupos de Diabetes Mellitus G03/212 i Red de Centros Diabetes y Enfermedades Metabólicas RD06/0015/0033), del Pla Nacional I+D+I (SAF2005-01262), del CIBERDEM (para el estudio de Diabetes y Enfermedades Metabólicas, del Instituto Carlos III (CB07/08/0037), de la Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca (ajut per a grups de recerca consolidats 2005SGR 00673), i de dos projectes europeus: el Network of Excellence LIFESCIHEALTH (EUGENE2, Network of Functional Genomics of Type 2 Diabetes – NoE 512013) i el Beta Cell Therapy (Beta Cell Programming for Treatment of Diabetes – Integrated Project N°512145).

| | |
|----------------------|--|
| ABC | complex abidina-biotina |
| ADP | adenosina-5'-difosfat |
| Akt (PKB) | proteïna quinasa B |
| AMPc | adenosín monofosfat cíclic |
| APCs | cèl.lules presentadores d'antigen |
| ATP | adenosina-5'-trifosfat |
| BAD | proteïna pro-apoptòtica |
| BrdU | 5-bromo-2-deoxiuridina |
| BSA | albúmina sèrica bovina |
| CAM | molècules d'adhesió intercel.lular |
| CCR2 | <i>C-C chemokine receptor 2</i> |
| Cdk-4 | ciclina depenent de quinasa 4 |
| cDNA | àcid desoxiribonuclèic còpia |
| Con | control |
| cpm | contes per minut |
| CRE | element de resposta al cAMP |
| DAB | tetrahydroclorur 3,3-diaminobenzimida |
| DAG | diacilglicerol |
| DNA | àcid desoxirribonuclèic |
| DNAasa | desoxirribonucleasa |
| dNTP | deoxinucleòtid trifosfat |
| ECM | matriu extracel.lular |
| EDTA | etilendiaminotetraacetat |
| ELISA | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| FITC | <i>fluorecein isothiocyanate</i> |
| FoxO1 | Forkhead box O1 |
| g | grams |
| GK | glucoquinasa |
| GK | rates Goto-kakizaki |
| GLP-1 | pèptid similar a glucagó 1 |
| GLUT-2 | transportador de glucosa 2 |
| GSK-3 | <i>glycogen synthase kinase-3</i> |
| GTT | test de tolerància a la glucosa |
| HGF | factor de creixement d'hepatòcits |
| HNF3 β (FoxA2) | <i>Hepatocyte nuclear factor 3β (Forkhead box A2)</i> |
| IGF-I | factor de creixement similar a la insulina I |
| IGF-IR | receptor del factor de creixement similar a la insulina I |
| IGF-II | factor de creixement similar a la insulina II |
| IGFBP | proteïnes d'unió a factors de creixement similars a la insulina |
| IL | interleuquina |
| IFN | interferó |
| iNOS | òxid nítric sintasa induïble |
| IP3 | inositol trifosfat |
| IR | receptor de la insulina |
| IRS | substrat del receptor de la insulina |
| Kb | Kilobases |
| KDa | Kilodaltons |
| LPS | lipopolisacàrid |
| mg | mil·ligram |
| MHC | molècula del complex major d'histocompatibilitat |

| | |
|-------------------|--|
| mRNA | àcid ribonucleic missatger |
| mM | milimolar |
| MCP-1 | <i>Macrophage Chemoattractant Protein 1</i> |
| MHC | complex major d'histocompatibilitat |
| MLD | <i>multiple low dosis</i> |
| MVLD | <i>multiple very low dosis</i> |
| MMP-2 | metal.loproteïnasa 2 |
| MODY | <i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i> |
| mRNA | RNA missatger |
| NK | cèl·lula <i>Natural Killer</i> |
| NO | òxid nítric |
| NOD | ratolí <i>non obese diabetic</i> |
| p ³² | fósfor 32 |
| pb | parells de bases |
| PBS | tampó fosfato-salí |
| PCR | reacció en cadena de la polimerasa |
| PDX-1 (Ipf1) | <i>pancreatic duodenal homeobox 1 gene (insulin promoter factor-1)</i> |
| PFA | paraformaldèhid |
| PI-3K | fosfatidil inositol 3 quinasa |
| PKC | proteïna quinasa C |
| PP | polipèptid pancreàtic |
| Q-PCR | PCR quantitativa o PCR a temps real |
| RIA | radioimmunoassaig |
| RIP-I | promotor del gen de la insulina I de rata |
| RIP-I/IGF-I | gen quimèric promotor RIP – cDNA de l'IGF-I murí |
| RIP-I/VEGF | gen quimèric promotor RIP – cDNA del VEGF murí |
| RIP-I/IFN β | gen quimèric promotor RIP – cDNA del IFN β humà |
| rpm | revolucions per minut |
| RNA | àcid ribonuclèic |
| RNasa | ribonucleasa |
| RT | Reacció de la transcriptasa reversa |
| SDS | dodecilsulfat sòdic |
| SEM | error estàndard de la mitja |
| SSC | <i>salini sodium citrate</i> |
| ssDNA | DNA d'esperma de salmó |
| STZ | estreptozotocina (2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosourea)1-DdLucopiranos) |
| TAE | tampó tris-acetat-EDTA |
| TdT | dideoxinulceotiltransferasa |
| TE | tampó tris-EDTA |
| Tc | limfòcit T citotòxic |
| Tg | transgènic |
| Th | limfòcit T <i>helper</i> o col.laborador |
| TNF- α | factor de necrosi tumoral α |
| Tris | tris(hidroximetil)aminometà |
| TRITC | <i>texas red isothiocyanate</i> |
| TUNEL | <i>TdT-mediated dUTP nick labeling</i> |
| IU | unitats internacionals d'activitat enzimàtica |
| VEGF | factor de creixement de l'endoteli vascular |
| VEGFR-1/2 | receptor del factor de creixement de l'endoteli vascular 1/2 |
| x g | gravetats |

ÍNDIX

| | |
|---|-------------|
| I. PRESENTACIÓ | 1-2 |
| II. INTRODUCCIÓ | 3-50 |
| 1. DIABETIS MELLITUS | 3 |
| 1.1. Diabetis mellitus tipus 1 | 4 |
| 1.1.1. Característiques generals de la resposta immunitària. | 4 |
| 1.1.2. Mecanisme de l'atac autoimmune contra les cèl·lules β . | 5 |
| 1.1.2.1. <i>Principals citoquines pro-inflamatòries implicades en el procés diabètic.</i> | 6 |
| 1.1.2.2. <i>Factors implicats en l'inici de l'atac autoimmune en la diabetis tipus 1.</i> | 8 |
| 1.1.3. Models animals de diabetis tipus 1. | 9 |
| 1.1.3.1. <i>Models de diabetis espontanis: ratolins NOD (Non Obese Diabetic).</i> | 9 |
| 1.1.3.2. <i>Models induïts experimentalment: tractament amb estreptozotocina.</i> | 10 |
| 1.1.3.3. <i>Models induïts experimentalment: models d'animals transgènics.</i> | 10 |
| 1.2. Diabetis mellitus tipus 2. | 11 |
| 2. ESTRUCTURA DEL PÀNCREES ENDOCRÍ: ELS ILLOTS DE LANGERHANS. | 13 |
| 2.1. Cèl·lules endocrines de l'illot. | 13 |
| 2.2. Inervació de l'illot. | 14 |
| 2.3. Vascularització de l'illot. | 15 |
| 2.4. Proteïnes d'unió intercel·lular. | 19 |
| 2.5. Matriu extracel·lular (ECM). | 21 |
| 3. FUNCIÓ DE LA CÈL·LULA β PANCREÀTICA. | 24 |
| 4. REGULACIÓ DE LA MASSA DE CÈL·LULA β . | 27 |
| 4.1. Neogènesi de cèl·lules β . | 27 |
| 4.2. Replicació de cèl·lules β . | 28 |
| 4.2.1. Control de la replicació a la cèl·lula β : cicle cel·lular. | 29 |
| 4.2.1.1. <i>Control de la progressió del cicle cel·lular a la fase G_1.</i> | 31 |
| 4.3. Mort de la cèl·lula β . | 34 |
| 4.3.1. Mort cel·lular per necrosi. | 34 |
| 4.3.2. Mort cel·lular per apoptosi. | 35 |

| | |
|---|---------------|
| 5. FACTORS QUE REGULEN LA MASSA DE CÈL·LULA β I/O LA FUNCIONALITAT DELS ILLOTS PANCREÀTICS. | 38 |
| 5.1. Factor de creixement similar a la insulina 1 (IGF-I). | 38 |
| 5.1.1. Acció biològica i funció de l'IGF-I. | 38 |
| 5.1.2. Cascada de senyalització i inducció de la proliferació per l'IGF-I. | 39 |
| 5.1.3. Animals transgènics que expressen IGF-I en les cèl·lules β pancreàtiques (RIP-I/IGF-I). | 41 |
| 5.2. Factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF). | 43 |
| 5.2.1. Acció biològica i funció del VEGF. | 43 |
| 5.2.2. Isoformes del gen VEGF. | 44 |
| 5.2.3. Localització i regulació de l'expressió de VEGF. | 44 |
| 5.2.4. Estructura i funció dels Receptors de VEGF. | 45 |
| 5.2.5. Paper del VEGF en la formació i creixement del sistema vascular: vasculogènesi i angiogènesi. | 47 |
| 5.2.6. Paper de l'endoteli en el desenvolupament i la formació d'òrgans i teixits. | 48 |
| 5.2.7. Paper del VEGF i de l'endoteli en el desenvolupament del pàncrees endocrí. | 48 |
| 5.2.8. Paper del VEGF i de l'endoteli en la regeneració i el creixement del pàncrees. | 50 |
| | |
| III. OBJECTIUS | 51 |
| | |
| IV. RESULTATS | 52-124 |
| | |
| PART I. ESTUDI DELS MECANISMES PELS QUALS IGF-I INDUEIX LA REGENERACIÓ DEL PÀNCREES ENDOCRÍ. | 52-69 |
| | |
| 1. ESTUDI DEL METABOLISME DESPRÉS DE LA INDUCCIÓ DE DIABETIS EXPERIMENTAL MITJANÇANT EL TRACTAMENT AMB STZ (5 x 40 mg/kg). | 53 |
| 1.1. Seguiment de la glucèmia i la insulinèmia després del tractament amb 5 x 40 mg/Kg STZ. | 53 |
| 1.2. Anàlisi de la tolerància a la glucosa després del tractament amb STZ. | 55 |
| | |
| 2. ESTUDI DE L'EXPRESSIÓ DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA GLUT-2. | 56 |
| | |
| 3. DETERMINACIÓ DE LA TAXA DE REPLICACIÓ DE LES CÈL·LULES β PRE-EXISTENTS DESPRÉS DEL TRACTAMENT AMB STZ. | 57 |
| | |
| 4. EFECTE DE L'IGF-I EN EL CONTROL DEL CICLE CEL·LULAR | 59 |
| | |
| 5. CARACTERITZACIÓ DE LA VASCULARITZACIÓ DELS ILLOTS TRANSGÈNICS IGF-I I LA SEVA IMPLICACIÓ EN LA REGENERACIÓ DEL PÀNCREES ENDOCRÍ. | 66 |

| | |
|---|---------------|
| PART II. ESTUDI DELS PAPER DEL VEGF I DE L'ENDOTELI VASCULAR EN LA FUNCIÓ I LA VIABILITAT DEL PÀNCREES ENDOCRÍ. | 70-128 |
| 1. OBTENCIÓ DE RATOLINS TRANSGÈNICS QUE SOBREEXPRESSEN VEGF A LES CÈL·LULES β . | 71 |
| 1.1. Construcció del gen quimèric RIP-I/VEGF ₁₆₄ . | 71 |
| 1.2. Generació de ratolins transgènics mitjançant la microinjecció d'òcits fecundats. | 73 |
| 1.3. Anàlisi de l'expressió del gen quimèric RIP-I/VEGF. | 73 |
| 2. ESTUDI DE LA MORFOLOGIA I LA FUNCIONALITAT DE LA VASCULARITZACIÓ DELS ILLOTS EN ELS RATOLINS RIP-I/VEGF. | 76 |
| 2.1. Determinació del nivell de vascularització. | 76 |
| 2.1.1. Determinació del nivell de vascularització mitjançant el marcatge de la membrana basal de l'endoteli dels vasos. | 76 |
| 2.1.2. Determinació del nivell de vascularització mitjançant l'expressió de PECAM1. | 78 |
| 2.2. Estudi de la circulació i la permeabilitat vascular en els illots. | 79 |
| 3. ESTUDI MORFOLÒGIC DELS ILLOTS DE LANGERHANS. | 82 |
| 3.1. Estudi de la distribució de les cèl·lules endocrines de l'illot. | 82 |
| 3.2. Estudi de la càpsula de cèl·lules de Schwann dels illots transgènics. | 83 |
| 3.3. Estudi de l'adhesió cel·lular i la matriu extracel·lular de l'illot. | 84 |
| 3.4. Estudi morfomètric del pàncrees endocrí. | 86 |
| 3.4.1. Determinació de la massa de cèl·lula β dels animals RIP-I/VEGF. | 86 |
| 3.4.2. Determinació de la taxa de replicació i d'apoptosi de la cèl·lula β . | 89 |
| 4. ESTUDI METABÒLIC DELS ANIMALS RIP-I/VEGF JOVES. | 90 |
| 4.1. Determinació de la glucèmia i la insulinèmia. | 91 |
| 4.2. Estudi de la tolerància a la glucosa i de la secreció d'insulina <i>in vivo</i> . | 91 |
| 5. EVOLUCIÓ DEL FENOTIP DELS ANIMALS Tg VEGF 1 AMB L'EDAT. | 93 |
| 5.1. Seguiment de la glucèmia i la insulinèmia en els animals Tg VEGF 1. | 93 |
| 5.2. Estudi de la tolerància a la glucosa i la secreció d'insulina en els animals Tg VEGF 1 als 5 mesos. | 94 |

| | |
|--|----------------|
| 5.3. Anàlisi morfològica dels illots dels animals Tg VEGF 1 al llarg del temps. | 95 |
| 5.3.1. Anàlisi de la distribució de les cèl.lules endocrines de l'illot. | 95 |
| 5.3.2. Anàlisi de la vascularització dels illots. | 95 |
| 5.4. Determinació de la massa de cèl.lula β de la línia 1 als 8 mesos. | 98 |
| 5.5. Estudi del procés inflamatori en el pàncrees dels animals Tg VEGF 1. | 100 |
| 5.5.1. Caracterització de cèl.lules inflamatòries en el pàncrees dels Tg VEGF 1. | 101 |
| 5.5.2. Determinació de l'expressió de citoquines i marcadors d'infiltració a Tg VEGF 1. | 104 |
| 6. EVOLUCIÓ DEL FENOTIP DELS ANIMALS TG VEGF 2 AL LLARG DEL TEMPS. | 107 |
| 6.1. Estudi de l'homeòstasi de la glucosa dels animals Tg VEGF 2. | 107 |
| 6.2. Estudi morfològic dels illots en els animals Tg VEGF 2 d'un any d'edat. | 109 |
| 6.3. Determinació de la massa de cèl.lula β en els animals VEGF 2 d'un any. | 112 |
| 6.4. Estudi de la inflamació del pàncrees dels animals VEGF 2 d'un any. | 114 |
| 6.4.1. Caracterització dels leucòcits en el pàncrees dels animals VEGF 2 d'un any d'edat. | 114 |
| 6.4.2. Detecció de citoquines inflamatòries en els illots dels animals VEGF 2 d'un any. | 115 |
| 6.5. Estudi dels gens implicats en la funció dels illots en animals VEGF 2 vells. | 118 |
| 7. ESTUDI DE LA SUSCEPTIBILITAT DELS ANIMALS Tg VEGF 2 AL TRACTAMENT AMB ESTREPTOZOTOCINA (STZ). | 122 |
| 7.1. Determinació de la glucèmia i la insulinèmia després del tractament. | 122 |
| 7.2. Determinació de la tolerància a la glucosa i la secreció d'insulina <i>in vivo</i> . | 122 |
| 7.3. Determinació de la massa de cèl.lula β i anàlisi morfològic del pàncrees endocrí dels animals VEGF 2 tractats amb 5 x 20 mg/Kg STZ. | 124 |
| V. DISCUSSIÓ | 130-158 |
| PART I. ESTUDI DELS MECANISMES PELS QUALS IGF-I INDUEIX LA REGENERACIÓ DEL PÀNCREES ENDOCRÍ. | 130-137 |
| PART II. ESTUDI DEL PAPER DEL VEGF I DE L'ENDOTELI VASCULAR EN LA FUNCIÓ I LA VIABILITAT DEL PÀNCREES ENDOCRÍ. | 138-158 |

| | |
|---|----------------|
| VI. CONCLUSIONS | 159-160 |
| VII. MATERIALS I MÈTODES | 161-178 |
| 1. MATERIALS. | 161-163 |
| 1.1. Animals. | 161 |
| 1.2. Reactius. | 161 |
| 1.3. Sondes de DNA. | 161 |
| 1.4. Anticossos. | 162 |
| 2. MÈTODES. | 164-179 |
| 2.1. Obtenció i anàlisi de DNA. | 164 |
| 2.1.1. Preparació de DNA plasmídic. | 164 |
| 2.1.2. Manipulació enzimàtica del DNA. | 164 |
| 2.1.3. Aïllament i purificació de fragments de DNA. | 164 |
| 2.1.3.1. <i>Gels d'agarosa.</i> | <i>164</i> |
| 2.2. Purificació de fragments de DNA per <i>GeneClean</i> . | 165 |
| 2.3. Purificació de fragments de DNA per electroelusió. | 165 |
| 2.4. Construcció de molècules híbrides de DNA. | 164 |
| 2.5. Tècnica d'obtenció de ratolins transgènics. | 165 |
| 2.6. Detecció dels animals transgènics. | 166 |
| 2.6.1. Obtenció de DNA genòmic. | 166 |
| 2.6.2. Anàlisi de DNA per Southern Blot. | 166 |
| 2.6.2.1. <i>Digestió i electroforesi del DNA genòmic.</i> | <i>166</i> |
| 2.6.2.2. <i>Transferència del DNA a la membrana.</i> | <i>167</i> |
| 2.6.2.3. <i>Marcatge radioactiu de les sondes de DNA.</i> | <i>167</i> |
| 2.6.2.4. <i>Hibridació de la membrana.</i> | <i>168</i> |
| 2.6.2.5. <i>Rentats de la membrana i revelat.</i> | <i>168</i> |
| 2.6.3. Anàlisi del DNA per PCR. | 168 |
| 2.7. Extracció d'illots pancreàtics. | 169 |
| 2.8. Extracció de RNA. | 170 |
| 2.8.1. Extracció de RNA d'illots pancreàtics. | 170 |
| 2.8.2. Extracció de RNA de pàncrees total. | 170 |
| 2.9. PCR quantitativa a temps real. | 171 |
| 2.10. Extracció i anàlisi de proteïnes. | 173 |

| | |
|---|----------------|
| 2.10.1. Extracció de proteïnes d'illots pancreàtics. | 173 |
| 2.10.2. Determinació de la concentració de proteïnes. | 173 |
| 2.10.3. Anàlisi de l'expressió de proteïnes mitjançant Western blot. | 174 |
| 2.10.3.1. <i>Electroforèsi en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE).</i> | 174 |
| 2.10.3.2. <i>Transferència de proteïnes a membranes i immunodetecció.</i> | 174 |
| 2.11. Determinació de paràmetres sèrics. | 175 |
| 2.11.1. Glucosa. | 175 |
| 2.11.2. Insulina. | 175 |
| 2.11.3. VEGF. | 176 |
| 2.12. Test de tolerància a la glucosa. | 176 |
| 2.13. Secreció d'insulina <i>in vivo</i> . | 176 |
| 2.14. Inducció de la diabetis experimental mitjançant STZ. | 177 |
| 2.15. Anàlisi immunohistoquímica del pàncrees. | 177 |
| 2.15.1. Determinació de la massa de cèl·lula β . | 178 |
| 2.15.2. Detecció d'apoptosi en la cèl·lula β . | 178 |
| 2.15.3. Detecció de replicació en la cèl·lula β . | 178 |
| 2.16. Anàlisis dels tipus cel·lulars del pàncrees mitjançant FACS. | 179 |
| 2.17. Injecció intravenosa de dextrà-fluoresceïna. | 179 |
| 2.18. Anàlisi estadística. | 179 |
| VIII. BIBLIOGRAFIA | 180-191 |

I. PRESENTACIÓ

La Diabetis Mellitus tipus 1 i tipus 2 constitueixen la malaltia metabòlica més comú, que es caracteritza pel desenvolupament d'hiperglucèmia. Aquest increment en la glucèmia apareix com a conseqüència d'una disminució de la massa de cèl.lula β i una pèrdua de funció dels illots. Per tant, reestablir una massa de cèl.lula β capaç de mantenir una adequada homeòstasi de la glucosa és un dels principals reptes de la medicina regenerativa pel tractament de la Diabetis. Així doncs, és necessari conèixer els mecanismes implicats en el creixement, la regeneració i la funció del pàncrees endocrí.

En el nostre laboratori, havíem demostrat que l'expressió del factor de creixement IGF-I a les cèl.lules β de ratolins transgènics (RIP-I/IGF-I) era capaç de contrarrestar la hiperglucèmia diabètica i recuperar la massa de cèl.lula β , després de la inducció de diabetis experimental (George, 2002) i que, a més, protegia de l'apoptosi i la insulinitis en un model autoimmune (Casellas, 2006). Aquests resultats suggereixen que IGF-I podria ser un gen clau per regenerar el pàncrees endocrí i revertir la Diabetis. Per tant, en la **part I** d'aquest treball, vam estudiar els possibles mecanismes mitjançant els quals l'IGF-I era capaç d'induir la regeneració dels illots en aquests animals. Els ratolins transgènics IGF-I tractats amb estreptozotocina (STZ) presentaven un important increment en la taxa de replicació de les cèl.lules β . Per contra, aquest augment no es donava en els animals IGF-I sense tractar amb STZ. Això indicava que la regeneració es donava principalment per una proliferació de les cèl.lules β pre-existents, i que aquest increment en la proliferació només tenia lloc després de la inducció d'un dany a la cèl.lula β .

En els illots d'animals transgènics IGF-I, es va observar un increment en Cdk-4 (que promou la progressió del cicle cel.lular) i una disminució de l'inhibidor del cicle p27, suggerint una predisposició a replicar. No obstant, també es va observar un increment de l'expressió de l'inhibidor del cicle p21, juntament a uns nivells de ciclina D1 (reguladora de Cdk-4) similars als dels illots controls. D'aquesta manera, les cèl.lules β dels ratolins transgènics IGF-I sans presentaven un "fre" que bloquejava la sobreproliferació d'aquestes cèl.lules β , evitant una hiperplàsia dels illots. Per contra, després del tractament amb STZ, els nivells de p21 disminuïen i els de ciclina D1 augmentaven. Això induïa una major activació de la maquinària de control del cicle cel.lular i una major taxa de proliferació de les cèl.lules β . Així doncs, el nostre estudi suggereix que IGF-I podria utilitzar-se com una teràpia per la regeneració del pàncrees endocrí durant el procés diabètic, ja que promou un increment en la proliferació de les cèl.lules β només després de la inducció d'un dany.

Per a la reversió de la Diabetis, a més de la regeneració de la massa de cèl.lula β , és necessari el seu manteniment i una correcta funció. Recentment, s'ha descrit que molècules de la matriu extracel.lular de l'endoteli vascular dels illots promouen l'expressió de la insulina i la proliferació de les cèl.lules β (Nikolova, 2006). Per altra banda, la microcirculació dels illots i la seva permeabilitat controlen la secreció d'insulina i l'homeòstasi de la glucosa (Ballian, 2007). Així doncs, en la **part II** d'aquest treball es va estudiar el paper del factor pro-angiogènic VEGF i de les cèl.lules endotelials en la funcionalitat del pàncrees endocrí i el seu efecte en la regulació de la massa de cèl.lula β . Amb aquest objectiu, es van generar ratolins transgènics que sobreexpressaven VEGF a les cèl.lules β del pàncrees (RIP-I/VEGF). Es van obtenir dues línies, cadascuna amb diferent nivell d'expressió del transgèn: Tg VEGF 1, amb una elevada expressió i, Tg VEGF 2, amb una expressió més moderada.

Els animals transgènics d'ambdues línies presentaven illots desorganitzats amb un increment en la vascularització i un engruixement de la membrana basal, però la massa de cèl.lula β , la glucèmia, la insulinèmia i la secreció d'insulina *in vivo* no es modificaven. No obstant, amb l'edat, els animals Tg VEGF 1, esdevenien intolerants a la glucosa i, posteriorment, diabètics oberts. El pàncrees endocrí d'aquests ratolins Tg VEGF 1 mostrava un increment en l'expressió de diverses citoquines i una infiltració de macròfags, que portava a la destrucció dels illots pancreàtics. Per la seva banda, els ratolins Tg VEGF 2 desenvolupaven amb l'edat també una disminució en la secreció d'insulina, sense arribar a desenvolupar diabetes oberta. No obstant, els illots d'aquests animals mostraven una lleu infiltració de macròfags i un increment en la producció de citoquines pro-inflamatòries.

Per tant, la sobreproducció de VEGF i l'increment en la vascularització dels illots no milloraven ni la viabilitat ni la funcionalitat dels illots. Contràriament, nivells més alts de VEGF portaven, a llarg termini, a una inflamació crònica del pàncrees endocrí i a alteracions en la cèl.lula β , induint intolerància a la glucosa i, fins i tot, diabetes oberta.

II. INTRODUCCIÓ

1. DIABETIS MELLITUS

La Diabetis Mellitus és una malaltia metabòlica deguda a una disminució de la funcionalitat i la massa de cèl·lula β , que porten a una secreció d'insulina insuficient i hiperglucèmia. Presenta etiologies molt diverses i afecta a un 10% de la població mundial, essent, doncs, la malaltia metabòlica més comú. A més, els canvis a l'estil de vida han incrementat molt seva la incidència en les últimes dècades, i en els pròxim 10-20 anys el nombre de malalts es preveu que podria incrementar fins a arribar a proporcions de pandèmia (Atkinson, 2001).

La Diabetis Mellitus es classifica principalment en 2 categories: la diabetis tipus 1 i la diabetis tipus 2. La diabetis tipus 1 és causada per la destrucció autoimmune de les cèl·lules β del pàncrees, s'inicia sobretot en adolescents i infants i, afecta aproximadament a un 10% dels pacients diabètics. En canvi, la diabetis tipus 2 és causada per una resistència a la insulina juntament a una inadequada secreció d'aquesta hormona, per una deficient funció i massa de cèl·lula β ; s'inicia en edats més avançades i engloba al 90% dels diabètics (*The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*, 1997). En ambdues patologies, la insuficient secreció d'insulina porta a una incapacitat total o relativa de captar i metabolitzar la glucosa per part dels teixits perifèrics i, com a conseqüència, l'individu desenvolupa hiperglucèmia. A més, la falta de l'acció de la insulina al fetge impossibilita la inactivació de la via gluconeogènica i glucogenolítica, augmentant encara més la glucèmia.

En pacients diabètics de tipus 1, la teràpia que s'utilitza actualment és l'administració subcutània d'insulina exògena per mantenir la normoglucèmia (Pickup & Williams, 2003). Aquesta teràpia substitutòria amb insulina és imprescindible, no només per controlar la hiperglicèmia sinó també per evitar la cetoacidosi espontània que pot portar al coma diabètic o, fins i tot, a la mort. No obstant, encara que millora la qualitat de vida del pacient, aquesta teràpia no pot reproduir una secreció fisiològica de la insulina i, per tant, no evita el risc d'estadis d'hiperglucèmia i hipoglucèmia. Així, mitjançant el tractament amb insulina exògena no sempre s'aconsegueix el correcte control de la glucèmia, de manera que, a la llarga, es desenvolupen alteracions secundàries com nefropatia, retinopatia i neuropatia diabètiques. A més, aquesta teràpia condiciona i limita l'estil de vida dels pacients. En el cas de la diabetis tipus 1, molts pacients són nens que, sense una teràpia alternativa eficaç, depenen de les injeccions d'insulina durant tota la vida.

En general, els pacients de diabetis tipus 2 reben com a tractament hipoglucemiants orals i una dieta restringida, donat que sovint està associada a obesitat. No obstant, la deficiència en la secreció d'insulina i la pèrdua de massa de cèl·lula β empitjoren a mesura que la malaltia progressa i, alguns pacients han d'acabar tractant-se amb insulina per sobreviure, similarment a com ho fan els diabètics de tipus 1 (Moller, 2001). Tampoc en els pacients de diabetis tipus s'assoleix sempre un control de la glucèmia fisiològic, així que sovint també desenvolupen les alteracions secundàries descrites anteriorment. Així doncs, la diabetis mellitus tipus 1 i 2 són actualment la principal causa de ceguera en adults i les responsables d'un terç dels casos d'insuficiència renal crònica.

Per tots aquests motius, és necessari desenvolupar noves teràpies més eficients que puguin garantir un control de la glucèmia més acurat i que millorin les condicions de vida dels pacients.

1.1. Diabetis Mellitus tipus 1

La diabetis tipus 1 és deguda a l'atac autoimmune contra les cèl·lules β del pàncrees que condueix a una manca d'insulina circulant (Lowe, 1998). Actualment, se sap que el procés d'autoimmunitat i la destrucció de les cèl·lules β són progressius. A mesura que la massa de cèl·lula β decreix, s'altera la tolerància a la glucosa i apareix la hiperglucèmia. No obstant, no és fins que s'ha perdut més del 90 % de les cèl·lules β que es detecta la malaltia.

1.1.1. Característiques generals de la resposta immunitària.

La resposta immunitària es divideix en dos tipus principals: la immunitat natural (o innata) i la immunitat adquirida (o específica). La immunitat natural o innata inclou les barreres físiques, el sistema del complement, les cèl·lules fagocítiques (macròfags i neutròfils) i les cèl·lules NK (*natural killers*). Tots aquests mecanismes de defensa estan presents abans de l'atac del patogen i, a més, no diferencien entre la majoria de substàncies estranyes. Aquest tipus de resposta és ràpida i, és la primera en intervenir enfront d'un patogen.

En canvi, la resposta adquirida o específica reconeix específicament els antígens i és capaç d'amplificar-se amb cada exposició. Inclou principalment, limfòcits i anticossos, però també es

poden reclutar cèl·lules de la resposta innata durant una resposta específica, com per exemple macròfags. Existeixen dos tipus de resposta immunitària adquirida o específica (Abbas, 2000; Janeway, 2003):

1) Resposta mediada per anticossos (humoral o Th2): els anticossos o immunoglobulines circulen per la sang i els diferents fluids de l'organisme i s'uneixen específicament a l'antigen que els ha induït. La unió dels anticossos amb l'antigen, per una banda, els inactiva i impedeix que s'uneixin als receptors cel·lulars i, per l'altra banda, serveix com a marcatge, facilitant la seva fagocitació o, la seva destrucció pel sistema del complement. Les cèl·lules productores d'anticossos són els limfòcits B. També hi participen els limfòcits T $CD4^+$ (*helper* o col·laboradors) que secreten citoquines que ajuden a l'activació dels limfòcits B. En aquest tipus de resposta, les cèl·lules T $CD4^+$ són de tipus Th2.

2) Resposta mediada per cèl·lules (cel·lular o Th1): implica la producció de cèl·lules que reaccionen contra els antígens presentats a la superfície de cèl·lules de l'hoste. Reconeixen aquests antígens i indueixen, llavors, la mort de la cèl·lula diana. Aquestes cèl·lules són els limfòcits T $CD8^+$ o citotòxics. En aquest tipus de resposta també hi col·laboren els limfòcits T $CD4^+$ de tipus Th1 que reconeixen els antígens a la membrana de cèl·lules de l'hoste i actuen secretant senyals químiques (citoquines) per activar macròfags i ajudar a l'activació dels limfòcits T $CD8^+$.

1.1.2. Mecanisme de l'atac autoimmune contra les cèl·lules β .

El mecanisme exacte de l'atac autoimmune contra les cèl·lules β , així com la seva activació són qüestions encara desconegudes. En els pocs casos en que s'ha pogut estudiar el pàncrees de pacients humans al principi de la malaltia, s'ha trobat que els illots mostren una necrosi cel·lular i una infiltració limfocítica que es coneix com a insulitis. Aquesta infiltració està formada principalment per limfòcits T $CD8^+$ i $CD4^+$, però també s'hi troben, macròfags, cèl·lules dendrítiques i alguns limfòcits B.

La Diabetis Mellitus de tipus 1 és una malaltia autoimmune mediada principalment per limfòcits T $CD8^+$ o citotòxics, que ataquen específicament les cèl·lules β del pàncrees. Així, és una resposta immune de tipus Th1 o cel·lular (Mathis, 2001). No obstant, també s'ha detectat un component humoral (propi d'una resposta Th2), ja que en molts pacients s'observen elevats

nivells circulants d'auto-anticossos contra antigens de les cèl·lules β , com anticossos contra el citoplasma de les cèl·lules de l'illot (ICA), contra la insulina (IAA), i contra l'àcid glutàmic descarboxilasa (GADA) (Atkinson, 2001). No està clar, però, si aquests autoanticossos poden participar en la inducció de la malaltia o si, en canvi, són el resultat del dany induït per les cèl·lules T citotòxiques i de la conseqüent alliberació d'antigens. Tanmateix, en alguns nens emparentats amb malalts ja diagnosticats, que encara no han desenvolupat la malaltia, la detecció d'aquests autoanticossos contra les cèl·lules de l'illot permet predir l'aparició de diabetis tipus 1.

Els limfòcits T $CD8^+$ citotòxics indueixen la mort de les cèl·lules β de forma directa (Kagi, 1997), i també a través de la producció de citoquines inflammatòries (IL- 1β , TNF- α i IFN- γ). Per la seva banda, les cèl·lules T $CD4^+$ Th1 produeixen citoquines de tipus Th1 (IL-2, IFN- γ i TNF- β) que indueixen una resposta cel·lular citotòxica.

Per contra, les cèl·lules T $CD4^+$ de tipus Th2 secreten IL-4, IL-6 i IL-10 i així, desencadenen una immunitat humoral. La resposta immune contra un antigen sol ser bàsicament d'un tipus, de manera que quan es desencadena, per exemple, una resposta humoral, s'inhibeix una resposta cel·lular. Així, la producció de citoquines Th2 indueix una resposta Th2 i inhibeix una resposta Th1. Atès que la diabetis tipus 1 es considera deguda a un atac de tipus Th1, una transició de la resposta immune Th1 cap a Th2, s'ha relacionat amb una prevenció de la malaltia (Abbas, 1995; Yoon, 2001). Així, el tractament amb citoquines de tipus Th2, com IL-4 i IL-10 protegeix el pàncrees endocrí contra el desenvolupament de diabetis tipus 1 en models animals (Yang, 2002; Marselli, 2001).

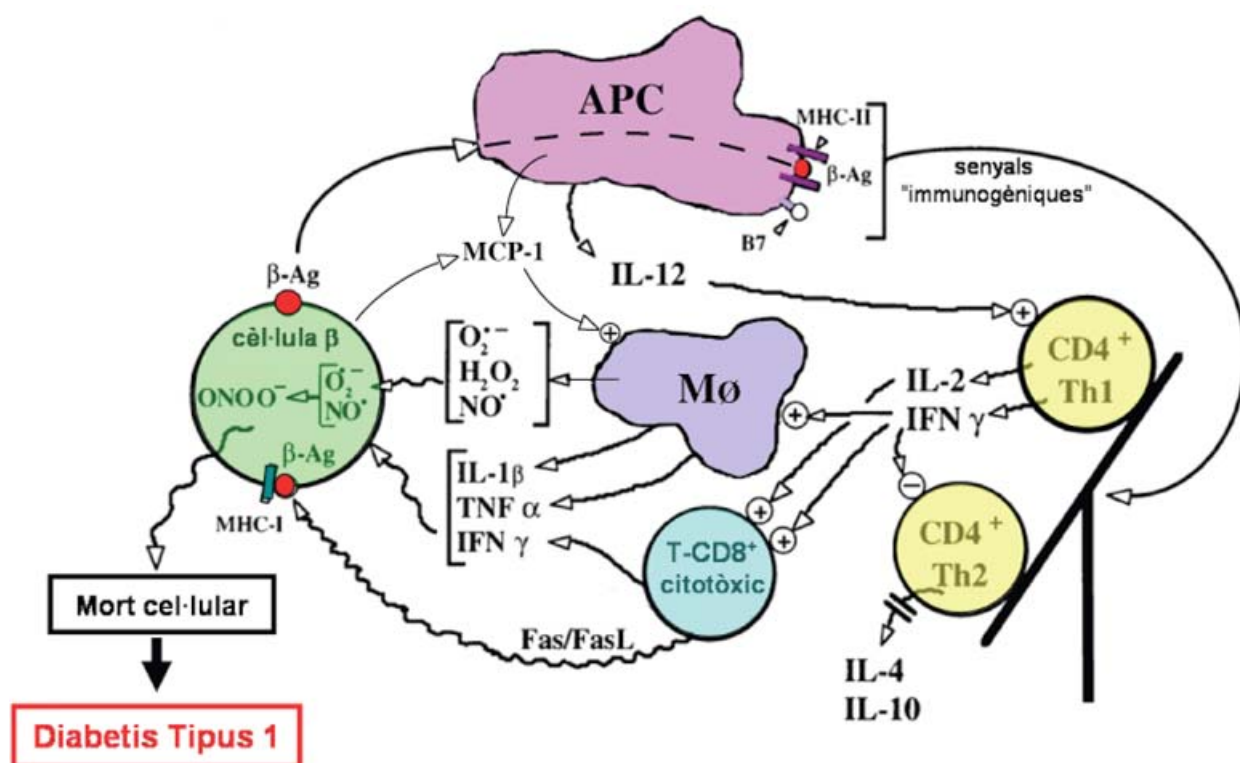
1.1.2.1. Principals citoquines pro-inflamatòries implicades en el procés diabètic.

Les citoquines són pèptids que actuen controlant la resposta immune, tant local com sistèmica. Es considera que unes de les principals citoquines pro-inflamatòries són IL- 1β i TNF- α (Schmid-Schömed, 2006; Yang, 2007). La IL- 1β és produïda per diferents tipus cel·lulars, però principalment per macròfags/monòcits, fibroblasts i cèl·lules endotelials en resposta a diferents estímuls. En canvi, TNF- α és secretat bàsicament per macròfags/monòcits i per limfòcits T.

Els macròfags/monòcits produeixen IL- 1β i TNF- α en resposta a diferents factors: patògens, altres citoquines inflammatòries, etc. La funció principal d'aquestes citoquines és

promoure l'adherència dels leucòcits a les cèl·lules endotelials (mitjançant l'expressió de molècules d'adhesió com I-CAM-1), induir l'extravassació de leucòcits i estimular a neutròfils i macròfags/monòcits perquè produeixin radicals lliures i proteases (Camacho, 2001).

Una altra citoquina pro-inflamatòria implicada en la disfunció i mortalitat dels illots durant el procés diabètic és MCP-1 (*Macrophage Chemoattractant Protein 1*). Aquesta molècula atrau monòcits, limfòcits T i cèl·lules NK al lloc de la inflamació.



Esquema 1. Esquema de les cèl·lules i citoquines que intervenen en la destrucció de les cèl·lules β i el desenvolupament de diabetis tipus 1. Els autoantígens de les cèl·lules β activen les cèl·lules presentadores d'antígens (APCs), cèl·lules dendrítiques i macròfags, principalment. Les APCs presenten els antigens de les cèl·lules β a les cèl·lules T $CD4^+$ mitjançant molècules MHC-II. Quan s'activen principalment cèl·lules T $CD4^+$ de tipus Th1, aquestes produeixen citoquines pro-inflamatòries (IL-2, IFN γ) que inhibiran l'activació de cèl·lules Th2 i activaran als macròfags i cèl·lules T $CD8^+$. A més, les APC o les pròpies cèl·lules β secreten MCP-1 i altres citoquines que recluten macròfags. Els macròfags i les cèl·lules T $CD8^+$ porten a terme la destrucció de les cèl·lules β per diferents mecanismes: per una banda, interacció directa amb els MHC-I de les cèl·lules β i mort per la via Fas/FasL, i, per l'altra, mitjançant mediadors inflamatoris com per exemple radicals lliures i NO o bé, citoquines (IL-1, TNF α , IFN γ). (Adaptació de Rabinovitch & Suarez-Pinzon, 1998).

1.1.2.2. Factors implicats en l'inici de l'atac autoimmune en la diabetis tipus 1.

S'han descrit diversos gens associats amb el desenvolupament de la malaltia i, estudis en bessons monozigòtics, demostren que els factors ambientals també hi participen. Així, factors ambientals activarien mecanismes autoimmunes en individus genèticament susceptibles (Zimmet, 2001; Haverkos, 1997).

-Factors ambientals.

Alguns d'aquests factors serien infeccions víriques (Andreoletti, 1997), alguns antibiòtics (Myers, 2001), la dieta (Schrezenmeir, 2000) o bé, l'estrés (Zimmet, 2001).

-Factors genètics.

Actualment, s'han identificat més de vint regions del genoma humà implicades en la predisposició i/o acceleració del desenvolupament de la diabetis tipus 1. El 40% dels casos de diabetis familiar en la població caucàsica estan relacionats amb polimorfismes en els gens del complex major d'histocompatibilitat (MHC) (Todd, 1996). Les molècules de MHC són glicoproteïnes de membrana que uneixen antígens processats dins de les cèl·lules i els exposen a l'exterior per tal de presentar-los a les diferents poblacions de limfòcits T (Tussey, 1995). Els polimorfismes en aquests gens determinen els tipus de pèptids que unirà la molècula de MHC i la interacció directa amb els receptors de les cèl·lules T. D'aquesta manera, els limfòcits T poden reconèixer un pèptid unit a una determinada variant al·lèlica de MHC, però no el mateix pèptid unit a un altre MHC.

Les molècules de MHC es divideixen en dues classes que es diferencien per la seva funció, estructura i distribució. Les molècules MHC de classe I s'expressen en tots els tipus cel·lulars nucleats de l'organisme. La seva funció és unir pèptids sintetitzats en el citosol de la pròpia cèl·lula (ja siguin del metabolisme cel·lular o del processament de patògens) i presentar-los a les cèl·lules T CD8⁺ citotòxiques, que eliminaran les cèl·lules diana (Janeway, 2003).

Les molècules de MHC de classe II s'expressen només a les cèl·lules presentadores d'antígens professionals (APC) del sistema immune, que són els macròfags, les cèl·lules dendrítiques i els limfòcits B. La molècula MHC de classe II presenta un pèptid no propi de la cèl·lula, processat per la via endocítica, que és reconegut per les cèl·lules T CD4⁺ que llavors col·laboren en l'activació dels macròfags i els limfòcits B. (Abbas, 2000).

1.1.3. Models animals de diabetis tipus 1.

1.1.3.1. Models de diabetis espontanis: ratolins NOD (Non Obese Diabetic).

Els ratolins NOD (*Non-obese Diabetic mice*) desenvolupen una diabetis sense obesitat, que és molt similar a la diabetis tipus 1 humana. Van ser descoberts l'any 1974 en els laboratoris Shinogi Research d'Osaka a partir d'una sublínia de ratolins Jc1-ICR. En aquests ratolins, només desenvolupen diabetis oberta aproximadament el 80% de les femelles i el 20% dels mascles (Makino, 1980) i, aquesta incidència és variable en funció de les condicions ambientals. Els símptomes apareixen aproximadament a les 12-14 setmanes i són: hipoinsulinèmia, hiperglicèmia i glucosúria.

El període que precedeix a l'aparició de diabetis oberta en els NOD es caracteritza per una infiltració de cèl·lules mononuclears en els illots, que comença cap a les 4 setmanes de vida i té un pic cap a les 8 setmanes. Els macròfags són, probablement, el primer tipus cel·lular que infiltra els illots en els primers estadis, seguits després pels limfòcits T. Aquesta fase pre-diabètica es caracteritza per la producció local de citoquines pro-inflamatòries com IL-1 β , TNF- α , IFN- γ i IL-6. L'alliberament d'aquestes citoquines indueix directament un dany a les cèl·lules β i, a la vegada, porta a la producció de MCP-1 que incrementa la insulinitis, produint-se una retroalimentació positiva de la resposta inflamatòria (Anderson, 2005; Yang, 2007).

1.1.3.2. Models induïts experimentalment: tractament amb estreptozotocina (STZ).

L'estreptozotocina (STZ), 2-deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosourea)1-Ddglucopiranos, és un antibiòtic d'ampli espectre produït pel microorganisme *Streptomyces achromogenes*, que entra específicament a les cèl·lules β ja que és reconegut exclusivament pel transportador de membrana GLUT-2 (Schnedl, 1994; Wang, 1998). Un cop dins de la cèl·lula produeix un efecte tòxic per tres mecanismes: metilació del DNA, generació de radicals lliures i producció d'òxid nítric (NO).

La descomposició del radical nitrós de la molècula de STZ genera un ió carboni (CH_3^+) que produeix el trencament del DNA per alquilació de bases. Com a conseqüència, s'indueix la reparació del DNA en la que intervé l'enzim poli(ADP-ribosa) sintetasa, el qual disminueix el

contingut cel·lular de NAD^+ i, per tant, té lloc una reducció en la producció d'energia i el metabolisme protèic, que desemboca finalment en la mort de la cèl·lula (Wilson, 1984).

El protocol d'administració de la STZ en determina el mecanisme d'acció. Així, l'administració d'una única dosi intraperitoneal d'elevada concentració de STZ (160 mg/kg) provoca la destrucció ràpida de les cèl·lules β per acció citotòxica directa, donant una pèrdua del 90% del contingut pancreàtic d'insulina i, per tant, hiperglucèmia. Alternativament, es poden administrar múltiples dosis a baixa concentració de STZ (40-50 mg/kg en una injecció durant 5 dies consecutius). Aquest mètode es coneix com *multiple low dose streptozotocin* o *MLDSTZ*. En aquest cas, es redueix l'efecte citotòxic directe de la STZ, però s'indueix una resposta inflamatòria contra les cèl·lules β , amb infiltració limfocitària (insulitis). No obstant, la susceptibilitat a desenvolupar insulitis i hiperglucèmia mitjançant aquest mètode es veu influenciat per l'edat, el sexe i la soca dels ratolins. Així, la soca C57Bl/Ksj i la colònia CD1 amb una dosi de 40 mg/kg presenten una major predisposició a desenvolupar insulitis que les soques BALB/c, C57Bl6/SJL i DBA/2J (Rossini, 1977).

1.1.3.3. Models induïts experimentalment: models d'animals transgènics.

Per de caracteritzar el paper de les diferents citoquines del sistema immune, s'han creat diversos animals transgènics models de diabetis mitjançant l'expressió d'aquestes citoquines específicament a les cèl·lules β dels illots sota el control del promotor del gen de la insulina de rata (RIP).

a) Els animals transgènics que expressen *IFN- γ* a les cèl·lules β pancreàtiques desenvolupen diabetis com a resultat d'una progressiva destrucció dels illots pancreàtics, causada per la infiltració limfocitària i un increment de l'expressió de MHC de classe II (Sarvetnick, 1990).

b) L'expressió de la citoquina *IL-2* en les cèl·lules β sota el control del promotor RIP causa una extensiva peri-infiltració en els illots però sense dany autoimmunitari ni desenvolupament de diabetis (Allison, 1992). No obstant, en un altre laboratori també s'ha generat un altre ratolí transgènic RIP/*IL-2*, que a diferència del model anterior, sí desenvolupa diabetis, degut a una resposta inflamatòria en els illots que porta a la destrucció de les cèl·lules β , sense evidència d'una especificitat antigènica (Elliot, 1994). Una possible explicació d'aquesta diferent capacitat

d'induir diabetis per part de l'IL-2, en un i altre model, podrien ser uns nivells d'expressió diferents.

c) L'expressió transgènica de *TNF- α* en les cèl·lules β provoca una severa inflamació, amb un infiltrat ric en cèl·lules B, cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺, juntament a un increment en l'expressió de V-CAM-1 i I-CAM-1 (molècules d'adhesió de leucòcits) a l'endoteli vascular dels illots. No obstant, aquesta resposta inflamatòria no dóna ni disminució del contingut d'insulina dels illots ni diabetis (Picarella, 1993). Per tant, la inflamació causada per l'expressió de *TNF- α* *per se* no és diabetogènica (Higuchi, 1992; Picarella, 1993).

d) Els ratolins transgènics que expressen *IL-6* sota el control del promotor RIP presenten insulitis i illots hiperplàstics i desorganitzats. L'expressió d'insulina i la tolerància a la glucosa no es veuen alterades. Amb l'edat, l'infiltrat incrementa amb el reclutament de macròfags, limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺ i, sobretot, limfòcits B. Així, *IL-6* indueix el reclutament i la diferenciació de cèl·lules B a cèl·lules plasmàtiques, però la seva sobreexpressió als illots no porta a diabetis (Campbell, 1994).

e) L'expressió de *MCP-1* específicament a les cèl·lules β en els animals RIP-MCP-1, indueix insulitis, principalment de monòcits, però sense desenvolupament de diabetis. Aquest infiltrat dels illots és ric en macròfags F4/80⁺. Per tant, la infiltració de macròfags als illots no és suficient per induir la destrucció de les cèl·lules β . (Grewal, 1997).

1.2. Diabetis Mellitus tipus 2.

La diabetis tipus 2 és el resultat d'una resistència a l'hormona a nivell del fetge i teixits perifèrics, acompanyada d'un defecte en la secreció de la insulina (Lowe, 1998). La presenten al voltant del 90% dels pacients diabètics i apareix normalment en individus majors de 40 anys, encara que cada vegada es diagnostica en individus més joves.

Les causes que indueixen a desenvolupar diabetis tipus 2 encara són desconegudes. Per una banda, factors genètics i factors ambientals condueixen a una resistència a la insulina. Aquests factors poden ser una susceptibilitat genètica, obesitat, etc. Per l'altra, aquests o altres factors

porten a una disminució en la funcionalitat i la massa de la cèl·lula β , que no pot secretar la insulina en resposta a la glucosa d'una forma adequada i suficient per compensar la resistència a l'hormona.

La resistència a la insulina pot ser deguda a diferents causes. La disminució en l'expressió del receptor d'insulina (IR) i alteracions en la seva cascada de senyalització poden afectar la transducció de la senyal de la insulina. Recentment, s'ha relacionat la deficient senyalització de la via de la insulina amb processos inflamatoris en els teixits perifèrics, amb presència de nivells elevats de citocines inflamatòries, com IL-6, TNF α i MCP-1 (Mandrup-Poulsen, 2003).

En estadis inicials de la malaltia, que podríem considerar de pre-diabetis, les cèl·lules β intenten compensar la resistència a la insulina incrementant la massa de cèl·lula β i/o la secreció d'insulina. Llavors, el procés diabètic apareix quan les cèl·lules β no són capaces de continuar compensant aquesta resistència i es produeix una insuficient secreció d'insulina (Kahn, 2001; Weir, 2001; Kasuga, 2006; Butler, 2007).

A la llarga, en alguns pacients, té lloc una pèrdua molt important de la massa de cèl·lules β del pàncrees i, per tant, aquests individus esdevenen insulino-dependents de manera similar als pacients de diabetis tipus 1. Els factors desencadenants de l'apoptosi de les cèl·lules β en els pacients de diabetis tipus 2 són diversos: una hiperglucèmia persistent, nivells elevats d'àcids grassos lliures o la presència de citocines inflamatòries com IL-1 β , TNF- α o IL-6 (Mandrup-Poulsen, 2003). Així, els processos inflamatoris en la diabetis tipus 2 estarien implicats, tant en el desenvolupament de resistència a la insulina com en la disfunció dels illots pancreàtics i la pèrdua de massa de cèl·lula β .

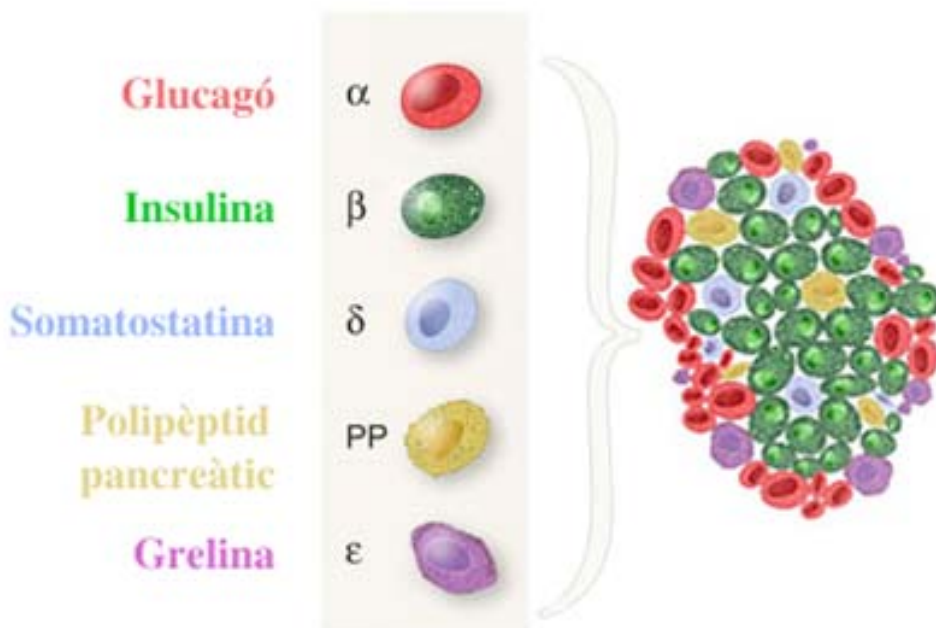
Així doncs, tant la diabetis tipus 1 com la diabetis tipus 2, són conseqüència d'una deficiència en la funcionalitat i la massa de les cèl·lules β que, en ambdues patologies, estarien relacionats amb processos autoimmunes o inflamatoris. Per tant, podrien tractar-se de dues evolucions d'una mateixa malaltia, que es distingirien únicament per la rapidesa en la mort de les cèl·lules β i pels mecanismes iniciadors i efectors d'aquest procés (Mathis, 2001; Donath, 2003; Mandrup-Poulsen, 2003; Donath, 2005).

2. ESTRUCTURA DEL PÀNCREES ENDOCRÍ: ELS ILLOTS DE LANGERHANS.

2.1. Cèl·lules endocrines de l'illot.

El pàncrees és un òrgan en el que es poden diferenciar dues parts: el teixit exocrí i el teixit endocrí. El pàncrees exocrí està format per les cèl·lules acinars que produeixen els enzims digestius i pels conductes pancreàtics, que permeten la secreció d'aquests enzims al duodè. Per la seva part, el pàncrees endocrí està constituït per agrupacions de cèl·lules endocrines que formen els anomenats illots de Langerhans. Aquests illots regulen el metabolisme mitjançant la secreció d'hormones al torrent circulatori. Les hormones secretades pels illots pancreàtics poden actuar a nivell endocrí sobre òrgans distants, com el fetge o el múscul esquelètic i, també, localment, sobre altres cèl·lules de l'illot i regular-ne, així, la seva funció (Pickup& Williams, 2003; Cabrera, 2006). Els illots estan formats per diferents tipus de cèl·lules endocrines, les quals presenten una distribució i unes proporcions particulars dins l'illot, aquestes cèl·lules són:

1. Cèl·lules β : secreten insulina. Són el tipus cel·lular més nombrós dels illots (essent el 60% de l'illot en humans i el 70% en ratolins). En els illots de rosegadors, les cèl·lules β ocupen principalment la part central. En canvi, en els illots humans, aquesta distribució no és tan clara, ja que al centre de l'illot s'hi troben tant cèl·lules β com no β .
2. Cèl·lules α : secreten glucagó. Constitueixen el 25% de les cèl·lules endocrines de l'illot i es distribueixen principalment per la perifèria. No obstant, també se les pot trobar envoltant els capil·lars de l'illot.
3. Cèl·lules δ : secreten somatostatina i representen un 10% de les cèl·lules insulars. Es distribueixen per la perifèria de l'illot i a prop dels capil·lars, com les cèl·lules α .
4. Cèl·lules PP: secreten polipèptid pancreàtic i representen un 5% de les cèl·lules endocrines de l'illot. També se situen al voltant dels capil·lars i a la perifèria de l'illot.
5. Cèl·lules ϵ : secreten grelina. Han estat recentment descobertes i suposen menys d'un 1% de les cèl·lules de l'illot. La seva distribució dins l'illot és aleatòria.



Esquema 2. Esquema dels diferents tipus de cèl·lules endocrines i de la seva distribució en els illots de Langerhans de ratolí. (Adaptat de BetaCellConsortium, 2004)

Els illots pancreàtics no són només una massa de cèl·lules endocrines, sinó que s'hi troben altres tipus cel·lulars no endocrins, que configuren la inervació i la irrigació sanguínia de l'illot. Les terminacions nervioses que arriben als illots estan formades pels axons de neurones i per cèl·lules de Schwann, les quals constitueixen una xarxa que envolta els illots. Les cèl·lules principals de la vascularització de l'illot són les cèl·lules de l'endoteli vascular, que constitueixen una part important del volum dels illots. D'aquesta manera, els illots pancreàtics estan molt ben inervats i vascularitzats, i així, la seva activitat ve regulada tant pel sistema nerviós autònom com pel sistema circulatori.

2.2. Inervació de l'illot.

Els nervis que entren als illots estan formats per axons de neurones envoltats per cèl·lules astroglials anomenades cèl·lules de Schwann. També hi ha altres cèl·lules de Schwann que són no-mielinitzants i que no embolcallen els nervis, sinó que formen una xarxa al voltant dels illots.

Així, les cèl·lules de Schwann formen una càpsula que embolcalla els illots i que separa les cèl·lules endocrines del teixit connectiu i del teixit exocrí (Sunami, 2001).

El pàncrees endocrí és un teixit dinàmic en el que les cèl·lules endocrines moren i en neixen de noves. Per contra, la inervació dels illots és molt estable i es manté durant tota la vida de l'organisme (Burris, 2007). No obstant, es troben processos de remodelatge de la inervació insular i de la càpsula de cèl·lules de Schwann dels illots en models animals de diabetis tipus 1 i en pacients diabètics humans, fet que suggeriria una relació amb el desenvolupament de la malaltia (Winer, 2003; Burris, 2007). A més, també s'han relacionat les cèl·lules de Schwann amb l'activació del procés autoimmune, com a antigens inductors de l'atac (Carrillo, 2005). Així, s'han detectat auto-anticossos i cèl·lules T reactives contra proteïnes gials de les cèl·lules de Schwann com la GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) (Winer, 2003).

2.3. Vascularització de l'illot.

Els vasos més grans de l'organisme són les venes i les artèries. Estan formats per una paret interna de cèl·lules endotelials recoberta per la seva làmina basal i, a continuació, per una capa de teixit conjuntiu i de musculatura llisa. Els vasos més petits són els capil·lars i els sinusoides, que estan formats només per cèl·lules endotelials i la seva làmina basal i, poden estar recoberts per pericits.

Els grans vasos (venes i artèries) que arriben al pàncrees es van subdividint en vènules i arterioles que desemboquen als illots pancreàtics on, finalment formen capil·lars. Així, en el pàncrees endocrí, l'intercanvi de nutrients, hormones i productes d'excreció té lloc als capil·lars.

El pàncrees endocrí, encara que constitueix un 1% de la massa del pàncrees, li arriba un aport sanguini que correspon al 5-15% del de tot l'òrgan. Així doncs, els illots de Langerhans presenten una abundant microcirculació (amb un flux sanguini deu vegades superior que el pàncrees exocrí) i que permet la regulació de la seva funció endocrina a través de factors del torrent sanguini i l'aport ràpid a la sang de les hormones secretades (Becker, 1995; Pickup & Williams, 2003).

Tots els illots del pàncrees estan connectats en paral·lel a la circulació arterial, assegurant-se, així, que estiguin exposats al mateix estímul hormonal i nutricional. Així, l'aport sanguini arriba a través d'unes arterioles aferents que entren a cada illot en paral·lel. Dins de l'illot, les arterioles es ramifiquen en capil·lars, formant una estructura esfèrica amb funció i morfologia similar als glomèruls renals. Les cèl·lules endocrines dels illots queden dins d'aquesta estructura, i estan associades als vasos. Les cèl·lules β estan polaritzades i tenen alhora dues cares en contacte amb l'endoteli dels capil·lars: una cara apical, per a la secreció hormonal i, una altra basal, amb funció sensora (Bonner-Weir, 1998). Les hormones secretades per l'illot s'alliberen directament als capil·lars sanguinis encarregats de recollir-les i, a través de la vena porta, són transportades cap al fetge i a la resta de l'organisme (Becker, 1995; Pickup & Williams, 2003). Així doncs, la vascularització insular regula la funció de l'illot, ja que permet l'arribada de nutrients i oxigen a les cèl·lules endocrines i de senyals reguladors nutricionals i hormonals i, alhora, permet l'accés de les hormones secretades al torrent sanguini.

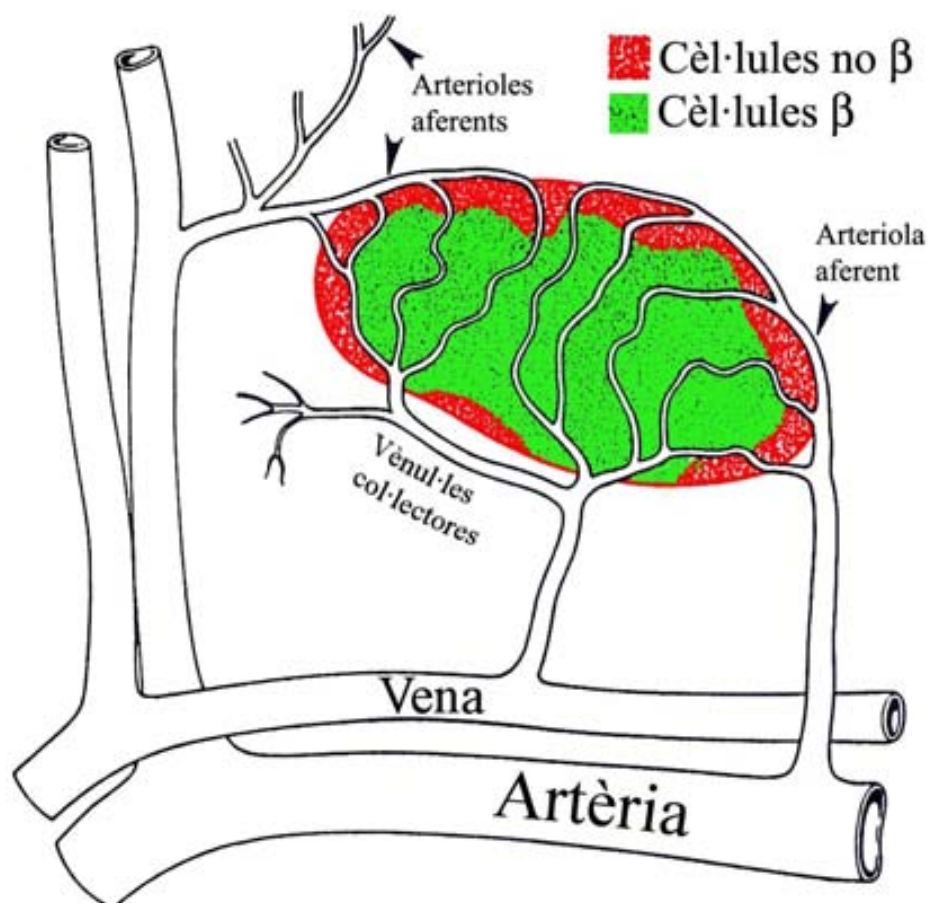
Les cèl·lules endotelials que formen la microcirculació dels illots presenten característiques morfològiques i funcionals específiques relacionades amb la seva funció en aquest teixit. La principal diferència és que són molt fenestrades; tenen cinc vegades més fenestracions que l'endoteli del teixit exocrí. A més, les cèl·lules endotelials dels illots estan fortament unides entre elles per unions estretes o oclusives (veure apartat 2.4), impedingint el pas de nutrients i hormones entre les cèl·lules, par tal que estigui finament regulat (Olsson, 2006, Ballian, 2007)

Les fenestracions dels capil·lars dels illots permeten l'accés directe de les cèl·lules endocrines al torrent sanguini. Per tant, la permeabilitat vascular és imprescindible pel correcte funcionament de l'illot. L'encarregat del control de la permeabilitat i de la formació de fenestracions als vasos dels illots és el factor de creixement específic de l'endoteli, el VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) que és secretat per les cèl·lules β pancreàtiques (Christofori, 1995; Kuroda, 1995; Brissova, 2006). Aquesta secreció no és constant, sinó que es dóna al mateix temps que la secreció d'insulina, permetent, així, incrementar la permeabilitat vascular en el moment en que es produeix la secreció d'insulina per tal que aquesta arribi ràpidament a la circulació. D'aquesta manera, la permeabilitat dels vasos dels illots no és constant, sinó que es veu incrementada per una major concentració de glucosa en sang (Liu, 1993). En els ratolins en què s'ha inactivat l'expressió de VEGF específicament a les cèl·lules β , el desenvolupament dels capil·lars es troba severament interromput i, els pocs vasos que hi ha són no fenestrats. Aquests animals presenten intolerància a la glucosa, per una alteració en la

secreció d'insulina, deguda a les alteracions en els vasos i en la seva permeabilitat, donant una deficient arribada de la insulina al torrent circulatori (Lammert, 2003).

S'han observat anomalies en la regulació del flux sanguini en diferents models animals de diabetis tipus 2, com les rates GK (Homo-Delarche, 2006). Aquestes alteracions podrien contribuir a la patogènesi de la malaltia donant una disminució de la supervivència i de la funció dels illots. Actualment, encara no es coneix completament l'estructura de la vascularització i el flux sanguini dins dels illots de Langerhans. No obstant, al 1995, en un simposi internacional sobre la microcirculació dels illots (*International Symposium of Islet Microcirculation*), es van redactar 3 models diferents sobre la distribució i la direcció del flux dins dels illots (Brunnicardi, 1996). Els tres models considerats com a vàlids són:

- 1- Model 1 (de cèl·lules no- β cap a cèl·lules β): en aquest model, les hormones secretades per les cèl·lules no β (la somatostatina, el glucagó i el polipèptid pancreàtic) regulen la secreció d'insulina, mentre que la insulina no pot afectar la secreció de les altres hormones de l'illot, ja que les cèl·lules no β són perfosos abans que les cèl·lules β . Aquest model es basa en una citoarquitectura de l'illot molt determinada, amb les cèl·lules no- β a la perifèria i les β al centre, que és el patró propi de ratolins, rates i conills. En aquests illots, les arterioles aferents arriben a la perifèria de l'illot, es divideixen en vasos més petits i irriguen primer les cèl·lules no- β . La sang, llavors, va cap al centre de l'illot, perfón les cèl·lules β i surt a través de vènules. Altres espècies com els cavalls tenen illots amb una citoarquitectura "inversa", és a dir, les cèl·lules β ocupen la perifèria de l'illot i les no- β estan al centre. En aquests animals s'ha demostrat la presència de la circulació des del centre cap a la perifèria, recolzant la teoria que la circulació des de les cèl·lules no- β cap a β és bàsica per la fisiologia de l'illot de diverses espècies.



Esquema 3. Esquema de la vascularització d'un illot de Langerhans propi de rosegadors seguint el model 1 (cèl·lules no β cap a cèl·lula β). La sang entra a l'illot a través d'una a tres arterioles, irrigant primer les cèl·lules no- β que es troben al mantell de la perifèria. Després d'irrigar les cèl·lules β del centre de l'illot surten per les vènules (Adaptat de Brunicardi, 1996).

- 2- Model 2 (de cèl·lules β cap a cèl·lules no- β): les cèl·lules β són les primeres en ser irrigades i la insulina secretada regula la secreció d'hormones de la resta de cèl·lules de l'illot. Els illots humans i de la resta de primats tenen una estructura més complexa que els illots dels rosegadors, amb una distribució irregular. En realitat, se'ls considera formats per la fusió de petites subunitats, que tenen cadascuna les cèl·lules no- β a la perifèria i les β al centre. En aquest cas, d'una a tres arterioles travessen la perifèria de l'illot i arriben al centre on es ramifiquen en capil·lars que irriguen el centre i després la perifèria de l'illot. En els illots més grans, els capil·lars desemboquen en vènules dins del propi illot mentre que en els més petits, els capil·lars surten dels illots i es troben amb les vènules que recullen la sang en el teixit exocrí.

- 3- Model 3: aquest model es coneix com a model de microcirculació polar. En aquest cas, es considera que una arteriola arriba a un costat de l'illot (pol aferent) i immediatament es ramifica en capil·lars que irriguen tots els tipus cel·lulars d'aquest costat de l'illot. Després la sang surt per l'altra banda de l'illot (pol eferent) i les cèl·lules endocrines d'aquesta banda són irrigades independentment de si són β o no- β . Aquest és l'únic model en que totes les interaccions entre els diferents tipus cel·lulars del pàncrees endocrí són possibles i que dona evidències de la capacitat inhibidora de la somatostatina sobre les α o les β i com aquesta inhibició es donaria mitjançant la microcirculació i no només de forma paracrina.

A més dels tres models de circulació interna dels illots, s'ha demostrat que en els illots existeix una microcirculació formada per uns pocs vasos que recorren només la perifèria i entren en contacte principalment amb les cèl·lules $\alpha\delta$ i PP, per desembocar després en les vècules que envolten l'illot.

2.4. Proteïnes d'unió intercel·lular.

Els illots de Langerhans es podrien considerar petits òrgans endocrins. Així, la comunicació i la interacció entre les cèl·lules que els formen en permeten una funció coordinada, que no es donaria si es tractés d'un conjunt de cèl·lules endocrines independents. Per tant, les unions intercel·lulars, que són les encarregades de mantenir la unió entre cèl·lules, són clau en la funcionalitat dels illots.

Les proteïnes d'unió intercel·lular són el conjunt de molècules que formen l'estructura a través de la qual una cèl·lula s'uneix a una altra cèl·lula. Poden classificar-se en tres tipus funcionals:

1- Unions de comunicació intercel·lular: inclouen unions *gap* (que formen un porus de comunicació a la membrana de les dues cèl·lules unides) i les sinapsis elèctriques.

2- Unions d'oclusió o estretes: es troben en cèl·lules epitelials. Els teixits epitelials es troben revestint conductes i superfícies com l'intestí, els conductes pancreàtics, etc. Presenten, doncs, una funció de barrera que implica una forta unió entre cèl·lules, que impedeixi el pas de petites

molècules entre les dues superfícies de l'epiteli. Així, s'ha de donar un transport transcel·lular selectiu i controlat. En són un exemple clar les unions entre les cèl·lules endotelials dels vasos. Aquestes cèl·lules es mantenen fortament unides mitjançant aquestes unions d'oclusió o estretes, de manera que en condicions fisiològiques, el contingut de la sang extravassa cap a fora dels vasos de forma controlada. En els illots de Langerhans, aquestes unions entre les cèl·lules de l'endoteli vascular permeten un pas regulat de molècules només a través de les pròpies cèl·lules endotelials i no entremig d'elles. Així, l'endoteli pot controlar el flux d'arribada de nutrients i secretagogs a les cèl·lules endocrines i, l'entrada de les hormones al torrent circulatori (Anderson, 1993; Schneeberger, 1992; Olsson, 2006, Ballian, 2007).

3- Unions d'ancuratge: uneixen les cèl·lules a través del seu citoesquelet a les cèl·lules veïnes o a la matriu extracel·lular i no són tan fortes com les unions d'oclusió. Estan formades per dos tipus de proteïnes (Sttaper, 1993):

a.- *Les proteïnes d'adhesió intracel·lular* que formen una placa a la cara citoplasmàtica de la membrana cel·lular i connecten amb els filaments del citoesquelet.

b.- *Les molècules d'adhesió intercel·lular* o CAM (*Cell-cell Adhesion Molecules*) són glucoproteïnes transmembranals que connecten per una banda amb les molècules d'adhesió intercel·lular de la cèl·lula adjacent i, per l'altra, amb les proteïnes d'adhesió intracel·lular. Aquestes es divideixen en depenents de Ca^{++} i no depenents de Ca^{++} .

b.1-*Proteïnes d'unió cèl·lula-cèl·lula depenents de Ca^{++} (Cadherines)*:

Les cadherines són les responsables de les unions intercel·lulars depenents de Ca^{++} . Són glucoproteïnes amb un domini transmembrana i cinc dominis extracel·lulars que canvien de conformació en absència de Ca^{++} , i llavors són degradades per proteases. S'anomenen amb la primera lletra del text on es van descriure per primera vegada, així, l'E-cadherina, es va trobar en epitelis (Geiger, 1992). L'E-cadherina forma unions homofíliques en les que una molècula d'E-cadherina s'uneix, per una banda, als filaments del citoesquelet d'una cèl·lula i, per l'altra, a una altra molècula d'E-cadherina que al seu torn travessa la membrana plasmàtica de la cèl·lula adjacent i s'uneix als seus filaments del citoesquelet. L'E-cadherina és la molècula d'adhesió principal per la qual s'uneixen les cèl·lules β dels illots de Langerhans. S'ha descrit que els animals manipulats genèticament amb l'expressió d'aquest gen inactivada específicament les cèl·lules β , presenten illots desorganitzats i alteracions en la secreció d'insulina (Dahl, 1996). En

aquest model, s'ha relacionat l'alteració en la secreció amb la deficiència en l'adhesió i la comunicació entre les cèl·lules β . Així, s'ha suggerit que els contactes cèl·lula β -cèl·lula β són necessaris per la correcta secreció d'insulina, ja que la comunicació entre cèl·lules β permet oscil·lacions coordinades en la concentració de Ca^{++} intracel·lular (Hauge-Evans, 1999).

b.2.-Proteïnes d'unió cèl·lula-cèl·lula independents de Ca^{++} :

Aquestes molècules són proteïnes que pertanyen a la superfamília de les immunoglobulines, ja que tenen un o més dominis de tipus Ig. L'exemple més ben caracteritzat és la molècula d'adhesió N-CAM, descrita per primer cop en neurones (d'aquí el nom) però que es troba en altres tipus cel·lulars, com per exemple unint els diferents tipus de cèl·lules endocrines de l'illot pancreàtic (Cirulli, 1994; Esni, 1999). Les CAM Ca^{++} -independents, normalment, formen unions homofíliques, però existeixen excepcions. Així, les I-CAM s'expressen en les cèl·lules endotelials quan són activades durant un procés d'inflamació i permeten, així, la unió dels leucòcits a l'endoteli. En aquest cas, la I-CAM de la cèl·lula endotelial no s'uneix a una altra I-CAM, sinó que reconeix una integrina de la membrana plasmàtica del leucòcit i el reté per permetre la seva extravassació cap al teixit inflammat. Les molècules d'adhesió N-CAM s'expressen en els illots pancreàtics i s'han relacionat amb la comunicació entre els diferents tipus cel·lulars i la seva distribució dins de l'illot. Són més abundants en les cèl·lules no- β que en les β i es creu que, en part, és a través d'aquesta diferència en el nivell de N-CAM que les cèl·lules no- β i β es reconeixen i es distribueixen dins l'illot. Així, s'ha descrit que un increment en l'expressió de N-CAM a les β , de manera que iguali l'expressió de les cèl·lules no β , dóna lloc a una proporció d'unions illots desestructurats (Cirulli, 1994; Esni, 1999).

2.5. Matriu extracel·lular (ECM).

L'estructura dels illots no només depèn de les unions entre les cèl·lules, sinó també de la matriu extracel·lular d'alguns dels seus components. Així, dins de qualsevol teixit, les cèl·lules contacten entre elles mitjançant una complexa xarxa de macromolècules que elles mateixes secreten anomenada matriu extracel·lular o ECM (*extracellular matrix*). L'ECM, no només manté l'estructura tissular, permet la migració i la interacció entre les cèl·lules, sinó que subministra diferents senyals de supervivència, proliferació, etc. (Kreis, 1993).

En els teixits epitelials, les cèl·lules es troben fortament unides entre elles per unions intercel·lulars oclusives i adherents constituint el que anomenem epiteli, en que les cèl·lules estan totes orientades de la mateixa manera, formant una barrera natural. En aquest cas, l'ECM és poc abundant, no se la troba envoltant tota la perifèria cel·lular, sinó que forma una fina capa que es troba a la part basal de l'epiteli. Aquest tipus especialitzat d'ECM s'anomena làmina o membrana basal i està altament adaptada en mantenir la funció de barrera de l'epiteli. Un tipus de teixit epitelial és l'endoteli dels vasos sanguinis. Com a tot epiteli, l'endoteli vascular presenta una matriu extracel·lular anomenada membrana o làmina basal (Yurchenco, 1990).

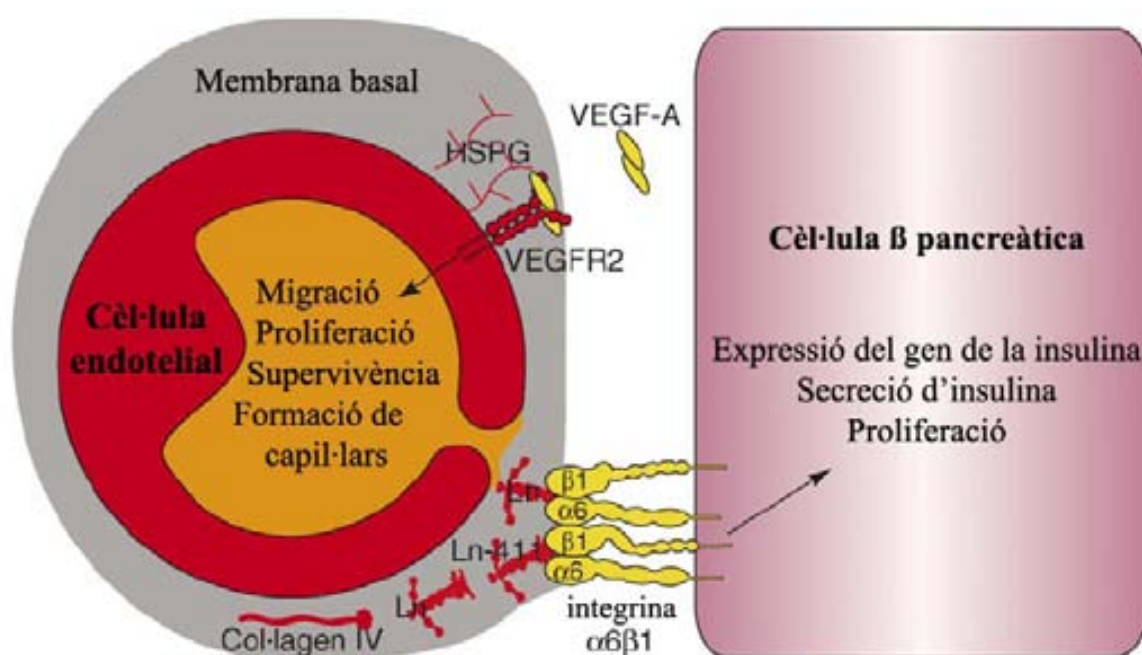
Els components de la matriu extracel·lular són:

1-Proteoglucans: són proteïnes que uneixen covalentment glucosaminoglicans (GAGs). Els GAGs estan formats per cadenes no ramificades de polisacàrids, formades per unitats repetides de disacàrids. Se'n poden diferenciar quatre tipus: i) àcid hialurònic, ii) condroitin-sulfat i dermatan-sulfat, iii) heparan sulfat i heparina i iv) queratan-sulfat.

2-Col·làgens: són les proteïnes més abundants de l'ECM. Es caracteritzen per la seva longitud, rigidesa i una estructura helicoidal de tres hebres. En cada teixit es troben diferents combinacions d'aquestes cadenes formant els diferents tipus de col·làgens, de manera que cada tipus de teixit presenta una matriu rica en uns col·làgens determinats. Els col·làgens tipus I, II, III, V i XI formen fibres i són els més abundants del teixit conjuntiu. Els tipus IX i XII són col·làgens units a fibres de col·lagen. Per últim, els col·làgens tipus IV i VII formen xarxes enlloc de fibres. En concret, el col·lagen tipus IV és el component essencial de la làmina o membrana basal de tots els epitelis. Per tant, la membrana basal de l'endoteli vascular de qualsevol òrgan, inclosos els illots pancreàtics, és constituïda principalment per col·lagen IV (Yurchenco, 1990).

La matriu extracel·lular, fins i tot en adults, pateix una constant renovació per degradació i síntesi dels seus components. Aquests processos permeten el creixement i la regeneració dels teixits. La degradació té lloc gràcies a dos tipus d'enzims proteolítics, secretats per les cèl·lules que componen el teixit, anomenats metal·loproteases (MMP) i serina proteases. La renovació de la matriu extracel·lular o làmina basal de l'endoteli es dona per acció principalment de dues metal·loproteases secretades per les pròpies cèl·lules endotelials, que són la MMP-2 i la MMP-9 (Wang, 1998; Visse, 2003; Song, 2006).

En els illots de Langerhans, com a la resta de teixits, l'ECM intervé en la distribució cel·lular i subministra de diferents senyals a les cèl·lules. No obstant, el component endocrí de l'illot, a diferència de les cèl·lules de Schwann i l'endoteli vascular, no formen una ECM pròpia (Nikolova, 2006). Per aquest motiu, les cèl·lules β requereixen de l'ECM de les cèl·lules endotelials adjacents per mantenir la seva funcionalitat i viabilitat. Les laminines de l'ECM de l'endoteli dels illots reconeixen les $\beta 1$ -integrines de les cèl·lules β i, a través d'aquesta interacció, promouen l'expressió del gen de la insulina i la proliferació de les cèl·lules β (Nikolova, 2006).



Esquema 4. Interacció entre cèl·lules endotelials i cèl·lules beta: importància de la membrana basal dels vasos. Les cèl·lules beta produeixen VEGF que s'uneix al receptor VEGFR-2 de les cèl·lules endotelials activant la seva migració, cap a les cèl·lules beta, la seva proliferació i la formació de capil·lars a dins l'illot. Les cèl·lules endotelials secreten diversos components de la matriu extracel·lular, com laminines o col·lagen IV. Les laminines s'uneixen a les integrines de les cèl·lules beta i això permet la inducció de l'expressió d'insulina i de la proliferació de les cèl·lules beta.

3. FUNCIÓ DE LA CÈL·LULA β PANCREÀTICA.

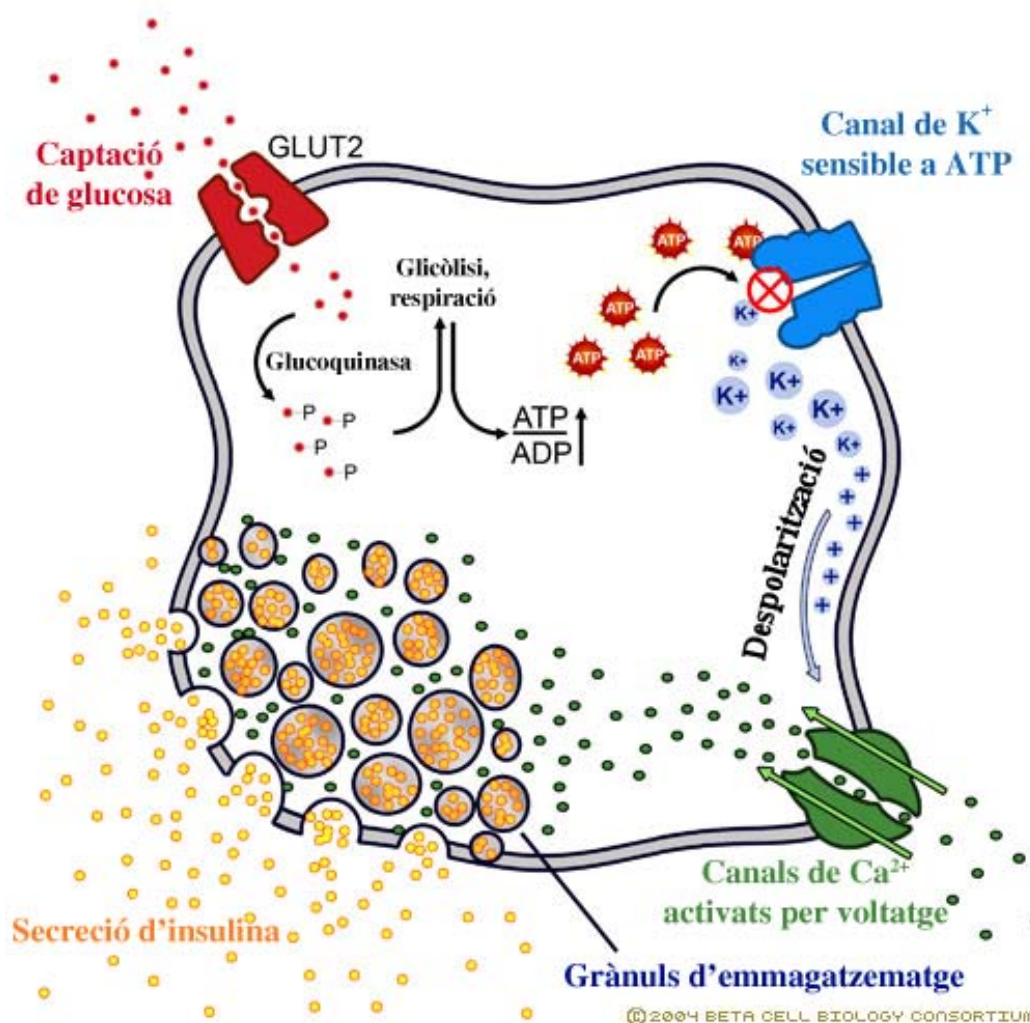
Les cèl·lules β són les principals responsables del control de la glucèmia mitjançant la secreció d'insulina, que és l'únic mitjà que té l'organisme per contrarestar la hiperglucèmia. Per tant, cal una precisa regulació de la seva secreció i biosíntesi.

L'estímul més important per la secreció d'insulina és la glucosa. La cèl·lula β actua com un sensor dels canvis en la concentració de glucosa dins d'un rang fisiològic. A més de la glucosa, existeixen altres factors reguladors que poden ser nutrients (com els aminoàcids leucina i arginina i, la manosa), neurotransmissors (acetilcolina i *Vasoactive Intestinal Peptide* (VIP)) i hormones (glucagó i *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1)). Així doncs, d'una banda, la funció dels illots està controlada per molècules que es troben en el sistema circulatori i que arriben de forma paracrina (com el glucagó) o endocrina (com els nutrients) a través de la circulació sanguínia de l'illot. I, per l'altra, per fibres del nervi vague (parasimpàtic) i pel nervi esplènic (simpàtic).

La secreció en resposta als secretagogs és molt ràpida, i s'atura també molt ràpidament quan l'estímul desapareix o quan apareix un estímul inhibitor. La glucosa entra dins de la cèl·lula β a través del transportador de glucosa GLUT-2, que presenta una afinitat molt elevada per aquest monosacàrid i permet la seva entrada. Un cop a dins de la cèl·lula β , la glucosa és fosforil·lada per l'enzim glucoquinasa (GK) donant glucosa-6-fosfat, entrant llavors a glucòlisi. L'enzim GK o hexoquinasa IV es caracteritza per una elevada K_m per la glucosa (de 5 a 8 mM), de manera que té la màxima activitat a concentracions fisiològiques i, no pot ser inhibida pel producte de la seva acció, la glucosa-6-P (Printz, 1993). Així doncs, el transportador GLUT-2 i la GK actuen conjuntament com a sensors de la glucosa, modulant la secreció d'insulina enfront els canvis de concentració de glucosa circulants.

El metabolisme de la glucosa dins la cèl·lula β (en la glucòlisi i en el cicle de Krebs) genera ATP i, és precisament l'increment en la ratio ATP/ADP la senyal que activa la secreció d'insulina. L'augment d'ATP intracel·lular provoca el tancament dels canals de potassi (K^+) dependents d'ATP i, com a conseqüència, es produeix una despol·larització de la membrana que indueix la obertura dels canals de calci (Ca^{2+}) dependents de voltatge. D'aquesta manera, té lloc l'entrada de Ca^{2+} i, el conseqüent increment en la seva concentració a l'interior de la cèl·lula.

Altres secretagogs actuen estimulant la fosfolipasa C (PLC) que actua sobre el fosfatidil inositol (PIP₂) generant inositol trifosfat (IP₃) i diacilglicerol (DAG). Per una banda, l'IP₃ permet l'alliberació del Ca²⁺ emmagatzemat en el reticle endoplasmàtic i activa la proteïna quinasa depenent de calmodulina. Per l'altra, el DAG activa la proteïna quinasa C (PKC) que fosforila diferents proteïnes implicades en el procés d'exocitosi dels grànuls d'insulina. Finalment, tota aquesta cascada de senyals dóna lloc a la fusió dels grànuls de secreció amb la membrana plasmàtica i, a més, activa l'expressió de la insulina (Pickup & Williams, 2003).



Esquema 5. Representació de la maquinària de secreció d'insulina en resposta a glucosa. La glucosa entra a la cèl·lula β a través del transportador GLUT-2 i és fosforilada per l'enzim glucoquinasa. La glucosa-6-fosfat entra a glicòlisi i cicle de Krebs i dóna un increment en ATP. Com a conseqüència de la pujada de la *ratio* ATP/ADP, els canals de K⁺ ATP-dependents es tanquen i es dóna una despolarització de la membrana plasmàtica. Llavors, els canals de Ca²⁺ s'obren i entra Ca²⁺ a la cèl·lula β . L'increment en la concentració de Ca²⁺ indueix la fusió dels grànuls d'insulina amb la membrana plasmàtica (adaptat de BetaCell Consortium, 2004).

L'expressió dels gens implicats en la funcionalitat de les cèl·lules β , com el gen de la insulina, el GLUT-2 o la GK és regulada per diversos factors de transcripció específics de les cèl·lules β que són, entre d'altres, Pdx-1 i HNF3 β (Yamaoka, 1999; Edlund, 2001). El factor de transcripció Pdx-1 (*Pancreatic duodenal homeobox-1*) és un dels principals factors de transcripció implicats en la funcionalitat de les cèl·lules β , ja que indueix l'expressió dels gens del transportador de glucosa GLUT-2 (Waeber, 1996), i la GK (Watada, 1996) entre d'altres. També regula l'expressió de la insulina i ho fa en resposta a glucosa (Ohlsson, 1991). Un increment en la glucèmia promou la fosforilació de Pdx-1 a través de diverses cascades de senyalització, permetent la seva translocació al nucli. (Babu, 2007). A més, Pdx-1 és un regulador positiu de la supervivència, i l'activació de la proliferació de les cèl·lules β (Ackermann, 2007). Així doncs, Pdx-1 és clau en el manteniment de la funcionalitat i la massa cèl·lules β . L'expressió del gen de Pdx-1 està regulada per altres factors de transcripció, com per exemple HNF3 β (Ben-Shushan, 2001; Servitja, 2004).

El factor de transcripció HNF3 β (*Hepatocyte nuclear factor 3 β*), també anomenat forkhead box A2, FoxA2, indueix l'expressió de Pdx1 a la cèl·lula β adulta (Wu, 1997; Lee, 2002). També regula la transcripció d'altres factors importants en el desenvolupament i la funció de la cèl·lula β com HNF4 α , HNF1 α , Nkx6.1 (Wilson, 2003; Servitja, 2004), les subunitats Kir6.2 i SUR1 del canal de potassi dependent d'ATP i el gen GLUT-2 (Sund, 2001; Lantz, 2004). Així, la gensupressió de HNF3 β a nivell de la cèl·lula β disminueix la secreció d'insulina en resposta a glucosa per una disminució de l'expressió dels gens SUR1, Kir6.2 i Glut-2 (Lantz, 2004).

Alteracions en l'expressió d'aquests factors de transcripció poden donar lloc a alteracions importants en el funcionament de les cèl·lules β pancreàtiques i fins i tot, poden donar el desenvolupament de diferents tipus de diabetis (Bell, 2001).

4. REGULACIÓ DE LA MASSA DE CÈL·LULA β .

En el pàncrees adult, la població de cèl·lula β no es manté constant sinó que és dinàmica i està sotmesa a canvis per tal d'adaptar-se a les necessitats metabòliques i mantenir la normoglicèmia. D'aquesta manera, la massa de cèl·lules β depèn de l'equilibri entre diferents mecanismes que porten a la seva expansió o la seva reducció (Bonner-Weir, 2001; Bouwens, 2005; Ackerman, 2007). L'expansió pot tenir lloc per hipertròfia de la cèl·lula β o per hiperplàsia (increment en el nombre). La reducció de la massa de cèl·lula β pot donar-se per atròfia de la cèl·lula β o per mort per apoptosi o per necrosi.

Així, un increment en la massa de cèl·lula β pot ser conseqüència de l'augment de volum cel·lular de la cèl·lula β o hipertròfia. No obstant, l'expansió de la massa de cèl·lula β per hipertròfia és molt limitada, de manera que, normalment, té lloc per un fenomen d'hiperplàsia o augment del nombre de cèl·lules β . La quantitat de cèl·lules β pot créixer per la replicació de les cèl·lules β pre-existents o per la neogènesi de cèl·lules β a partir de cèl·lules precursors.

4.1. Neogènesi de cèl·lules β .

La neogènesi de cèl·lules β o formació *de novo* podria donar-se a partir de cèl·lules mare o bé, per transdiferenciació de cèl·lules pancreàtiques adultes. No obstant, tradicionalment, s'ha considerat que les cèl·lules precursors de les cèl·lules β es troben a l'epiteli dels ductes pancreàtics. La neogènesi de cèl·lules endocrines que s'originen per diferenciació de les cèl·lules epitelials dels conductes s'anomena nesidoblastosis (Pictet & Rutter, 1972; Cantenys, 1981). Les primeres cèl·lules β que apareixen a l'embrió es formen per diferenciació de cèl·lules ductals i, per tant, aquest procés és el principal mecanisme de formació de cèl·lules β durant el desenvolupament embrionari (Pictet & Rutter, 1972; Cantenys, 1981).

Per contra, no existeixen proves conculents de la capacitat de diferenciació de cèl·lules β a partir de cèl·lules precursors en individus adults (Seaberg, 2004). Durant la vida adulta, s'han descrit processos de neogènesi de cèl·lules β a partir de l'epiteli ductal en diversos models experimentals. Així, s'ha observat neogènesi en pàncrees de rates sotmeses a pancreatectomia parcial (Bonner-Weir, 2005). També, s'han descrit processos de neogènesi en diferents animals sotmesos a la lligació d'un ducte pancreàtic. Aquesta tècnica porta a inflamació i mort de les

cèl·lules acinars i indueix un increment de la massa de cèl·lules β . Així, s'ha observat neogènesi en rates amb els conductes dels pàncrees lligats (Wang, 1995). També, recentment, s'ha descrit que després d'una lligació ductal, té lloc la formació d'illots a partir de cèl·lules precursors que pertanyen al llinatge de cèl·lules ductals, les quals expressen neurogenina 3 (Ngn3) transitòriament abans de diferenciar-se a cèl·lules endocrines (Xu, 2008). També, s'ha observat que els animals transgènics que sobreexpressen IFN- γ (interferó γ) en cèl·lules β (Gu, 1995) presenten un increment en la taxa de neogènesi després de la inducció de diabetis experimental.

4.2. Replicació de cèl·lules β .

Encara que s'han descrit processos de neogènesi en animals adults, sembla que la neogènesi seria un procés poc rellevant durant la vida adulta. S'ha demostrat que en rosegadors, el principal mecanisme de manteniment i expansió de la massa de cèl·lula β és la replicació de les cèl·lules β pre-existents (Dor, 2004; Georgia, 2004; Teta, 2007). Així doncs, la replicació és el mecanisme pel qual es genera una nova cèl·lula β a partir d'una altra cèl·lula β pre-existent (Hellerström et al., 1988). La replicació o proliferació de les cèl·lules β es dona en condicions fisiològiques per la pròpia renovació de les cèl·lules β , però també en condicions en que es requereix un creixement de la massa de cèl·lula β . Així, pot ser estimulada per la glucosa, per diferents hormones i per alguns factors de creixement. Per exemple, s'ha observat que, entre d'altres, els factors de creixement IGF-II (*Insulin-like Growth Factor II*) i HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) sobreexpressats en cèl·lules β de ratolins transgènics porten a un increment en la massa de cèl·lules β (Devedjian, 2000; Garcia-Ocaña, 2000).

En rosegadors, s'ha descrit que la taxa de replicació de les cèl·lules β a l'adult és d'un 2% (el 2% de les cèl·lules β estan en cicle) (Finegood, 1995). La proliferació de les cèl·lules β permet la renovació cel·lular, però, alhora, durant el primer any de vida, també dona un augment de la massa de cèl·lula β (Montanya, 2000). Així, mitjançant el marcatge i seguiment de llinatges cel·lulars en condicions normals i després d'una pancreatectomia parcial, s'ha demostrat que el manteniment i el creixement de la massa de cèl·lula β és degut a la replicació de cèl·lules β pre-existents, mentre que la neogènesi seria un procés marginal (Dor, 2004; Teta, 2007). A més, sembla que totes les cèl·lules β contribueixen per igual a l'expansió de la massa de cèl·lula β i que no hi ha cap subpoblació pre-destinada a replicar més que les altres (Brennand, 2007; Teta,

2007). Aquests estudis concordarien amb el fet que, l'increment de massa de cèl·lula β descrit en rates velles és degut a la presència d'illots de més gran tamany i no per una major densitat d'illots per àrea de pàncrees, és a dir, té lloc una expansió dels illots pre-existents més que no pas una formació d'illots nous (Montanya, 2000).

No obstant, cal considerar que la diferenciació de possibles cèl·lules precursors cap a cèl·lules β pot no activar-se després d'una pancreatectomia parcial, però sí durant el procés diabètic. Per altra banda, se sap que la dinàmica de la massa de cèl·lula β en el ratolí és diferent que en els humans. S'ha demostrat que la taxa de replicació de les cèl·lules β humanes és baixa (Butler, 2003). A més, en diferents estudis s'han observat processos de neogènesi en humans. Per tant, mentre en rosegadors, els indicis apunten a la duplicació de les pròpies cèl·lules β com a principal mecanisme d'expansió i manteniment de la massa de cèl·lula β , en humans sembla que la neogènesi podria tenir un paper important (Butler, 2007).

4.2.1. Control de la replicació a la cèl·lula β : cicle cel·lular.

La proliferació cel·lular permet el creixement i el manteniment dels teixits i el mecanisme pel qual ho fan està fortament regulat en un procés comú a tots els tipus de cèl·lules que anomenem cicle cel·lular. En la majoria teixits adults (exceptuant els que estan en constant creixement) les cèl·lules es troben en un estat de quiescència anomenat G_0 en el que hi poden romandre durant hores, dies o anys. Així, el nombre de cèl·lules que repliquen ve determinat pel nombre de cèl·lules que surten d'aquest estat G_0 i entren en cicle cel·lular i no pel temps que dura el cicle.

El cicle cel·lular es divideix en diferents fases. La mitosi o fase M és el procés de divisió nuclear, en que té lloc la condensació del contingut nuclear en cromosomes, per tal de repartir el material genètic entre les dues cèl·lules filles. A la majoria de tipus cel·lulars, la fase M és només una petita fracció del total del cicle.

La resta del cicle, és a dir, el període que va d'una fase M a la següent, es coneix com interfase. Per la seva banda, la interfase se subdivideix en diferents parts: la fase S, la fase G_1 i la fase G_2 . La fase S fa referència al moment en que es replica el DNA (S=síntesi). La fase G_1 (G=gap) correspon al lapse de temps entre la mitosi i la següent fase S, durant aquest període la

cèl·lula detecta si es donen les condicions necessàries perquè comenci la replicació del DNA i progressi el cicle cel·lular. I, per últim, la fase G_2 té lloc entre la fase S i la mitosi i permet a la cèl·lula assegurar-se que la replicació del DNA s'ha donat correctament i que, per tant, pot progressar la divisió del material genètic. La cèl·lula β té sempre un cicle cel·lular de 14.9 hores repartides en 2.5 hores de la fase G_1 , 6.4 hores de la fase S, 5.5 hores de la fase G_2 i 0,5 hores en fase M (Swenne, 1982).

El control del cicle cel·lular és realitzat per un conjunt d'activadors i inhibidors del cicle que es van activant i desactivant o, expressant i degradant a mesura que avança el cicle. Els activadors del cicle inclouen la família de les quinases dependents de ciclins o Cdks, que actuen fosforilant altres proteïnes; les ciclins, que són les subunitats reguladores de les Cdks i sense les quals les Cdks no poden ser actives i, les activadores de les quinases dependents de ciclina o Cka que poden ajudar a l'activació dels complexos Cdk-ciclina. Així, per a la progressió de la divisió és imprescindible l'activitat dels diferents complexos Cdk-ciclina que han d'actuar cadascun en el moment del cicle cel·lular que li correspon. L'expressió de les Cdks es manté a uns nivells més o menys constants mentre que les seves reguladores, les ciclins, se sintetitzen i es degraden cíclicament, de manera que els complexos són actius quan s'expressen les ciclins. Aquesta expressió és induïda per diferents factors de creixement i disminueix quan l'estímul mitogènic s'atura. Per altra banda, existeixen inhibidors del cicle cel·lular, d'entre aquests cal destacar els inhibidors de les quinases dependents de ciclina o Cki, que són de gran importància com a senyal negativa del creixement cel·lular.

En general, en el cas que el cicle s'hagi d'aturar, les senyals que el frenen actuen principalment durant la fase G_1 , que es considera el principal punt de control i, per això, se l'anomena també punt d'inici. Aquesta transició de la fase G_1 a la fase S és també el moment clau de regulació de la proliferació cel·lular a les cèl·lules β dels illots de Langerhans (Cózar-Castellano, 2006). En aquesta fase G_1 , si la cèl·lula troba les condicions nutricionals i de senyals de proliferació necessàries, té lloc el pas cap a la replicació del DNA o fase S. Perquè el cicle progressi cap a la síntesi del DNA cal l'expressió dels gens que constitueixen la maquinària de replicació i, perquè aquests gens s'expressin, cal l'activació dels complexos Cdk-ciclina propis de la fase G_1 . Durant la primera part de la fase G_1 s'expressen les ciclins D i després, durant la fase G_1 més tardana, la ciclina E. Les ciclins D se divideixen en tres subtipus: D1, D2 i D3 i, són les subunitats reguladores de les Cdk-4 i Cdk-6, mentre que la ciclina E és única i s'uneix a la Cdk-2.

4.2.1.1. Control de la progressió del cicle cel·lular a la fase G₁.

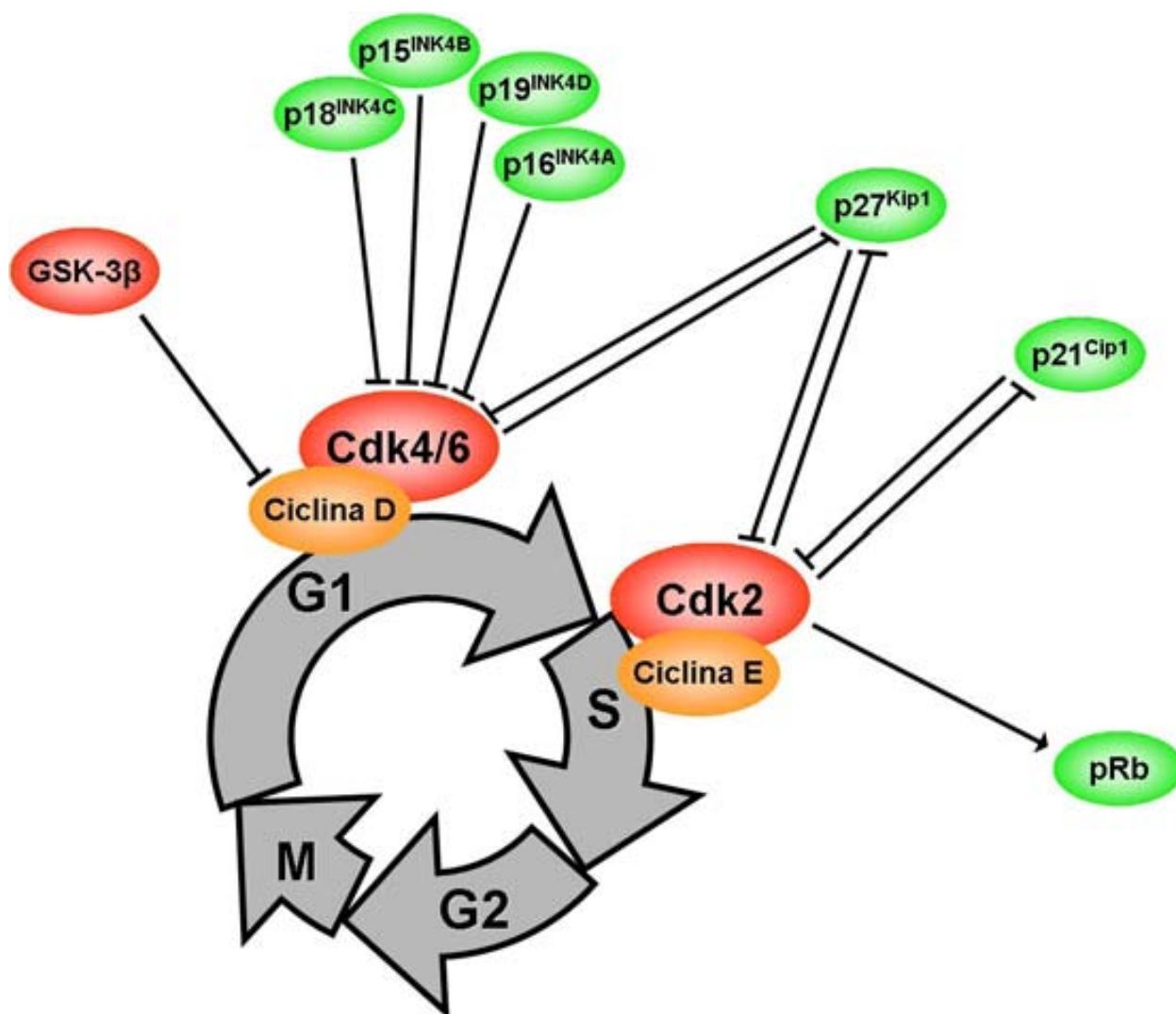
El primer pas de la transició de la fase G₁ a la fase S està regulat, doncs, pels complexos de la Cdk-4 i/o la Cdk-6 unides a les ciclines D. Aquests complexos porten a terme la fosforilació de la proteïna del Retinoblastoma o pRb per inactivar-la. Aquesta pRb és, en realitat, una família de proteïnes que inclou la pròpia pRb i les proteïnes p107 i p130, entre d'altres. La proteïna pRb defosforilada (activa) actua frenant el cicle per unió al factor de transcripció E2F, a deacetilases d'histones i a factors de remodelació de l'estructura de la cromatina, que queden així segrestats. El factor E2F és l'encarregat de transcriure els gens necessaris per la replicació del DNA i, que per tant, indueix la fase S. A les cèl·lules normals, la proteïna pRb està sempre present i varia només el seu estat de fosforilació (el grau de fosforilació augmenta amb estímuls mitogènics i disminueix quan la cèl·lula arriba a la mitosi o s'atura l'estímul mitogènic).

A diferència d'altres tipus cel·lulars, a la cèl·lula β de ratolí no s'hi expressa Cdk-6, és a dir, en aquest punt clau de control del cicle cel·lular només s'hi troba la Cdk-4 (Cozar-Castellano, 2006a). Sí que s'hi ha trobat l'expressió dels tres tipus diferents de ciclina D: D1, D2 i D3; però la ciclina D3, en menor quantitat. Mitjançant estudis amb animals geno-suprimits es creu que la ciclina D3 és de poca importància a la cèl·lula β (Kushner, 2002; Kushner, 2006). Així doncs, en els ratolins, el complex Cdk-4-ciclina D1 i el Cdk-4-ciclina D2 són clau per la proliferació de la cèl·lula β. De fet, els ratolins geno-suprimits per Cdk-4 presenten diabetis oberta abans dels dos mesos d'edat degut a una important disminució de la massa de cèl·lula β per manca de replicació de les cèl·lules β (Rane, 1999).

Així doncs, l'activitat de la Cdk-4, tant a la cèl·lula β com a altres tipus cel·lulars, ha d'estar molt regulada, tant per senyals intracel·lulars com extracel·lulars. En primer lloc, la seva acció depèn de la unió amb la ciclina D1 o la D2 que, per tant, han d'ésser sintetitzades. A més, com s'ha mencionat anteriorment, també existeixen inhibidors de les Cdks, les Cki i, activadors, les Cka. Els inhibidors inclouen dues famílies: les proteïnes inhibidores de quinases (INK) que per la Cdk-4 són les INK4 (les INK són exclusives de la Cdk-4 i de la 6) i les proteïnes inhibidores de ciclina o de quinasa (CIP o KIP). La família dels inhibidors INK4 està formada per p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} i p19^{INK4d} i actuen unint-se a la Cdk pel lloc d'unio amb la ciclina, de manera que impedeixen la unió de la ciclina amb la Cdk (Alberts, 2000; Malumbres, 2005).

La família de les CIP o KIP està formada per p21^{cip1}, p27^{kip1}, p57^{kip2}. En altres tipus cel·lulars diferents de la cèl·lula β , les KIP o CIP s'han descrit com a inhibidors del cicle. Actuen per unió als complexos Cdk-ciclina i inactiven la seva activitat quinasa. Aquesta inhibició es pot donar a través de tres mecanismes: pel bloqueig del lloc actiu de la quinasa Cdk, pel bloqueig del lloc per on s'uneix a la ciclina o per fosforilació de la Cdk (Alberts, 2000; Malumbres, 2005).

No obstant, pel que fa a les proteïnes p21^{cip1} i p27^{kip1}, el seu mecanisme d'acció, així com el seu paper en el cicle de la cèl·lula β no està del tot clar. Les Cdks, les ciclins i les Cki són tots sintetitzats al citoplasma, però les Cdks i les ciclins no tenen seqüència de localització nuclear (NLS) mentre que p21 i p27 sí que en tenen. Així, en algunes condicions, aquestes proteïnes poden actuar com a xaperones ensamblant la Cdk amb la ciclina i translocant el complex al nucli. Per exemple, en determinats tipus cel·lulars, una baixa concentració de p21 actua estabilitzant la unió de Cdk-4 amb la ciclina D i translocant el complex al nucli, de manera que ajuda a la progressió del cicle (Alberts, 2000; Malumbres, 2005). No obstant, la supressió de l'expressió de p21 a la cèl·lula β no disminueix la proliferació, així doncs, com a mínim no n'és imprescindible per a l'activitat de Cdk-4-ciclina D (Cózar-Castellano, 2006a). A més, aquests illots sense p21 tenen una replicació incrementada en resposta a factors de creixement, per tant, sembla que, a la cèl·lula β , p21 actua com a inhibidor del cicle cel·lular (Cózar-Castellano, 2006b). En models de diabetis tipus 2, com els ratolins db/db i ratolins sotmesos a una dieta alta en lípids, s'ha demostrat que una disminució en p27 incrementa la proliferació de les cèl·lules β i que la sobreexpressió de p27 a les cèl·lules β porta a hipoplàsia dels illots i diabetis (Uchida, 2005). Així doncs, a la cèl·lula β , p27 es considera també un inhibidor de la replicació.



Esquema 6. Representació esquemàtica de la progressió del cicle cel·lular entre les fases G₁ i S. En arribar un estímul pro-mitogènic a la cèl·lula, s'expressen les ciclins D que s'uneixen a Cdk-4 formant el complexe actiu. A continuació, s'expressa la ciclina E que s'uneix a la Cdk-2 formant també el complexe actiu. Els complexos Cdk/ciclina fosforilen la proteïna pRb, inactivant-la. Aquesta proteïna és el principal inhibidor de la progressió del cicle cel·lular de la fase G₁ a la S i, per tant, la seva inactivació permet la replicació. Els estímuls pro-mitogènics també actuen disminuint l'activitat o l'expressió dels inhibidors dels complexos Cdk/ciclina, com les p21, p27, p15, p16, p18, p19 o fosforilant i inactivant la GSK-3β que inhibeix l'expressió de les ciclins.

4.3. Mort de la cèl·lula β .

La renovació de les cèl·lules β , que té lloc en condicions fisiològiques, implica un procés de generació de noves cèl·lules i, un altre de mort. Aquesta mort controlada té lloc pel mecanisme de l'apoptosi.

Per altra banda, la disminució de la massa de cèl·lula β durant el procés diabètic és deguda a la mort d'aquestes cèl·lules per diferents mecanismes. En el cas de la diabetis tipus 1, la mort és conseqüència de l'atac autoimmune contra les cèl·lules β . Aquest atac és mediat principalment per limfòcits T citotòxics que indueixen l'apoptosi de les cèl·lules β . En la diabetis tipus 2, la hiperglucèmia, la hiperlipidèmia i la inflamació poden induir la mort de la cèl·lula β per apoptosi (Eizerik & Mandrup-Poulsen, 2001). No obstant, no es pot descartar que tingui lloc també una mort de la cèl·lula β per necrosi.

4.3.1. Mort cel·lular per necrosi.

La necrosi és la mort cel·lular accidental deguda a un dany (com isquèmia) o un trauma físic o químic i, sol ser un procés ràpid i inespecífic (Cameron, 2000). La seva principal característica és que desencadena una resposta inflamatòria que, sovint, indueix la mort de les cèl·lules veïnes, incrementant-se el procés de mort i inflamació. Durant la necrosi el reticle endoplasmàtic i els lisosomes s'inflen i es lisen, alliberant proteases que indueixen la destrucció autolítica de la cèl·lula. Tot el contingut intracel·lular és alliberat a l'espai extracel·lular, produint aquest procés inflamatori que promou l'activitat fagocítica de macròfags i neutròfils. Aquesta resposta inflamatòria és necessària per eliminar totes les restes cel·lulars i començar la reparació tissular.

Diversos experiments *in vitro* han demostrat que pot donar-se la mort de la cèl·lula β pel procés de necrosi. Així, s'ha descrit que el tractament amb dosis altes d'al·loxà o estreptozitocina (Hoorens, 1999) o l'exposició amb radicals oxidatius (Heller, 1994) porten a la necrosi o mort inespecífica de la cèl·lula β . existeixen moltes limitacions tècniques que impedeixen l'estudi dels processos de necrosi que puguin tenir lloc en els illots *in vivo*, per aquest motiu, encara actualment no es coneix fins a quin punt és important en el desenvolupament de diabetis.

4.3.2. Mort cel·lular per apoptosi.

Els organismes multicel·lulars han d'eliminar cèl·lules que es troben en excés o que poden ser potencialment perilloses. En aquest cas, les cèl·lules utilitzen un procés de mort programada anomenat apoptosi (DeLong, 1998; Alberts, 2000). L'apoptosi és un fenomen induït per canvis fisiològics a la pròpia cèl·lula o dins l'organisme, que impliquen sempre unes senyals cel·lulars que activin el procés. A més, és un procés actiu que requereix la síntesi de noves proteïnes i que, per tant, requereix també d'energia. Les cèl·lules en apoptosi mostren una sèrie de característiques morfològiques, diferents de les cèl·lules que moren per necrosi.

Primerament, es produeix una disminució del volum cel·lular total, un augment de la densitat cel·lular, una compactació dels orgànuls citoplasmàtics i una dilatació del reticle endoplasmàtic. A continuació, augmenta la porositat de la membrana mitocondrial, donant lloc a l'alliberament de les proteïnes mitocondrials cap al citoplasma i, com a conseqüència, té lloc l'alteració de la síntesi d'ATP i del potencial redox de la cèl·lula. La cromatina primer es condensa cap a la membrana nuclear i, després té lloc la degradació del DNA internucleosomal en fragments de 180-200 pb, donant fragments de DNA envoltats de membrana. La tècnica del TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick labeling*) aprofita aquesta característica de les cèl·lules apoptòtiques i permet la seva detecció, gràcies al marcatge dels extrems d'aquests fragments de DNA mitjançant un marcatge terminal amb dideoxinucleòtids dUTP per l'enzim dideoxinulceotiltransferasa (TdT). Finalment, la cèl·lula es fragmenta i el contingut cel·lular queda envoltat de membrana plasmàtica formant-se els cossos apoptòtics. Els macròfags i les cèl·lules adjacents reconeixen les cèl·lules apoptòtiques i fagociten els cossos apoptòtics, evitant, així, l'alliberament dels continguts intracel·lulars i per tant, la resposta inflamatòria (Schmid-Schonbein, 2006).

En el procés d'apoptosi hi estan implicats una família de proteases anomenades caspases. Les caspases degraden les proteïnes que reconeixen gràcies a una seqüència de quatre aminoàcids de l'extrem N-terminal. S'han descrit un total de 13 caspases que es classifiquen en (Hui, 2004):

a) efectores: degraden les proteïnes implicades en el manteniment de les estructures cel·lulars (citoesquelet, embolcall nuclear...), en la reparació del DNA, en els processos de transcripció i traducció. La principal és la caspasa 3.

b) transductores de senyal. Són principalment la caspasa 8 i la 9.

c) caspases que participen en processos inflamatoris.

Una altra família de proteïnes implicades en apoptosi són les proteïnes Bcl-2, que inclouen tant proteïnes pro-apoptòtiques (Bax, Bad, Bid, etc.) com anti-apoptòtiques (Bcl-2, Bcl-xl).

L'apoptosi pot ser induïda per diferents factors, tant intracel·lulars com extracel·lulars, que inclouen un desequilibri metabòlic, alteracions en el cicle cel·lular, danys en el DNA (mutacions irreparables), infeccions víriques, per una reducció en la quantitat de nutrients, de determinats factors de creixement o d'hormones o, per mediadors inflamatoris com les citoquines. Aquests factors inductors poden activar el procés d'apoptosi a través de dues vies de transducció de la senyal de mort que són:

-La via del receptor de mort o via extrínseca: aquesta és induïda per membres de la superfamília dels receptors de mort com el Fas/CD95 o el receptor 1 del factor de necrosi tumoral, TNFR. Per exemple, durant un atac immune, els limfòcits T CD8⁺ específics contra un tipus cel·lular indueixen la mort d'aquest cèl·lula a través de la unió del lligand de Fas a Fas i aquesta unió activa la via de mort a la cèl·lula diana. En aquesta via la caspasa transductora de senyal és la caspasa 8, que activa la caspasa 3 que és una efectora (Hui, 2007).

-La via mitocondrial o via intrínseca: aquesta via s'activa, per exemple, en resposta a danys interns com danys en el DNA o per alteracions en el cicle (Alberts, 2000). Es posa en marxa una cascada de senyals que acaba sempre en el mitocondri. Té lloc l'activació d'algun membre pro-apoptòtic de la família Bcl-2 (per exemple: Bax, Bad, Bim o Bid) que es transloca cap el mitocondri. Els membres pro- i anti-apoptòtics de la família del Bcl-2 competeixen per regular la permeabilitat i la sortida de diferents proteïnes des del mitocondri. La principal d'aquestes molècules mitocondrials és el citocrom c, el qual associat amb Apaf-1 i la procaspasa-9 formen el complex anomenat apoptosoma. Aquesta unió activa la procaspasa-9, la qual passa a caspasa 9, que és la principal caspasa transductora de senyal en aquesta via. La caspasa 9, llavors, activa la caspasa efectora 3 (Hui, 2007).

S'ha demostrat àmpliament la mort de les cèl·lules β per mort programada o apoptosi, tant *in vitro*, com *in vivo*. Així, illots en cultiu exposats a citocines pro-inflamatòries pateixen apoptosi (Giannoukakis, 2000). També s'han detectat cèl·lules apoptòtiques *in vivo* en pacients diabètics (Butler, 2007). En la diabetis tipus 1, la mort programada sovint segueix la via extrínseca o del receptor de mort. Aquesta pot ser induïda per cèl·lules T citotòxiques o per citocines produïdes per macròfags i cèl·lules T col·laboradores (Hui, 2007). Durant la diabetis tipus 2, s'ha postulat que la hiperglucèmia i la hipertrigliceridèmia porten a estrés oxidatiu dins de la cel·lula β que indueix l'apoptosi a través de la via intrínseca o mitocondrial (Eizerik & Mandrup-Poulsen, 2001). A més, també s'hi ha associat un increment de citocines en el pàncrees endocrí de pacients de diabetis tipus 2 (Mandrup-Poulsen, 2003). Per tant, l'estudi de la susceptibilitat de la cèl·lula β a desenvolupar apoptosi, així com la caracterització de factors capaços d'inhibir o protegir contra aquest tipus de mort (Bergerot, 1995; Giannoukakis, 2000; George, 2002; Casellas, 2006) són clau pel tractament i la prevenció de la diabetis.

5. FACTORS QUE REGULEN LA MASSA DE CÈL·LULA β I/O LA FUNCIONALITAT DELS ILLOTS PANCREÀTICS.

5.1. Factor de creixement similar a la insulina-I (IGF-I).

El Factor de creixement similar a la insulina I o IGF-I pertany a la família de factors de creixement de la insulina, al que també hi pertany el factor de creixement similar a la insulina II o IGF-II, amb els que conserva una elevada homologia (Rodríguez, 2007). L'IGF-I pot unir-se al seu propi receptor (IGF-IR) i, amb menys afinitat, al receptor de la insulina (IR) (Hintz, 1972; Morrione, 1977; Zapf, 1978). El receptor de la insulina (IR) i el receptor de l'IGF-I (IGF-IR) formen part d'una família de receptors tirosina-quinasa anomenats receptors tipus I. La seva estructura consta de quatre subunitats unides per ponts disulfur: 2 subunitats α extracel·lulars, i 2 subunitats β transmembrana amb l'activitat tirosina-quinasa (Massagué, 1982). Ambdós receptors, tant l'IR com l'IGF-IR fosforilen una família de molècules anomenades IRSs (Insulin Receptor Substrates) i, a continuació, indueixen cascades de senyalització molt similars amb moltes proteïnes comuns (Kulkarni, 2005).

Mentre la insulina actua principalment sobre el fetge, el múscul i el teixit adipós regulant el metabolisme i l'homeòstasi de la glucosa (Kahn CR, 1985), l'acció de l'IGF-I té lloc a tot l'organisme (Kahn CR, 1985; Daughaday, 1989). Aquestes diferències són degudes bàsicament a la diferent distribució dels respectius receptors, més que no pas a que aquests receptors indueixin cascades de senyalització diferents. Així, els teixits implicats en la captació i metabolització de la glucosa com, el fetge, el múscul esquelètic i el teixit adipós, tenen molts IRs i pocs IGF-IRs, mentre que, per exemple, les cèl·lules β dels illots pancreàtics presenten, sobretot, receptors d'IGF-I (Flier, 1986; Van Schravendijk, 1990).

5.1.1. Acció biològica i funció de l'IGF-I.

S'ha demostrat que l'IGF-I té un paper important en el desenvolupament del pàncrees ja que estimula la diferenciació i la proliferació de les cèl·lules β (Le Roith, 1997), encara que, durant aquest període embrionari, l'IGF-I és produït a nivells molt baixos al pàncrees. Per altra banda, s'ha observat una expressió d'IGF-I a nivells importants en les zones en regeneració dels pàncrees de gossos i rates adultes sotmeses a pancreatectomia parcial (Smith, 1991; Hayakawa,

1996; Dupont, 2003), per això, es considera que encara és més important pel creixement i la diferenciació del pàncrees durant el període post-natal. No obstant, encara existeixen discrepàncies pel que fa a la capacitat de l'IGF-I d'incrementar la massa de cèl·lula β . Així, la inactivació del seu receptor (IGF-IR) específicament a la cèl·lula β porta a intolerància a la glucosa però no modifica la massa de cèl·lula β (Kulkarni, 2002). Fins i tot, la inactivació del gen de l'IGF-I a les cèl·lules β pancreàtiques no només no disminueix la massa de cèl·lula β , sinó que indueix hiperplàsia dels illots (Lu, 2004).

Contràriament, sembla més àmpliament demostrat que l'IGF-I és un potent factor anti-apoptòtic i anti-inflamatori. Així, en diversos estudis, s'ha comprovat que en illots cultivats amb citoquines pro-inflamatòries com IL-1 β , TNF- α o INF- γ , l'IGF-I protegeix contra la inhibició de la secreció de la insulina i evita l'apoptosi, principalment per la disminució de l'expressió d'iNOS (òxid nítric sintasa induïble) i la producció d'òxid nítric (NO), (Mabley, 1997; Harrison M, 1998; Giannoukakis, 2000; Castrillo A, 2000). També s'ha descrit que protegeix de la insulitis i disminueix la susceptibilitat a desenvolupar diabetis en ratolins NOD (Bergerot, 1995).

Així doncs, seria d'interès caracteritzar la capacitat del factor IGF-I de regular i/o incrementar la massa de cèl·lula β *in vivo* i la seva acció pro-mitogènica sobre les cèl·lules β .

5.1.2. Cascada de senyalització i inducció de la proliferació per l'IGF-I.

La unió del lligand IGF-I amb les subunitats α del seu receptor IGF-IR indueix un canvi conformacional que activa l'activitat tirosina-quinasa de les subunitats β , les quals s'autofosforilen activant una cascada de fosforilacions. El primer pas de la via de senyalització tant de l'IR com de l'IGF-IR és la fosforilació de les proteïnes anomenades IRSs (substrates del receptor de la insulina) (White, 2002). D'aquests IRSs, el que sembla més important en la cascada de l'IGF-IR és l'IRS2. Així, s'ha descrit que l'efecte anti-apoptòtic i d'inducció de la proliferació per l'IGF-I és mediat per IRS2 (Lingohr, 2002). S'ha descrit que IRS2, a través d'aquesta cascada de senyalització, és clau en el control del desenvolupament i creixement de la massa de cèl·lula β . Així, els ratolins manipulats genèticament que presenten el gen IRS-2 inactiu (IRS2^{-/-}) desenvolupen diabetis, com a conseqüència d'una resistència a la insulina i una disminució de la massa de cèl·lula β (Withers, 1998; Withers, 1999). Els passos següents de la cascada de senyalització porten a l'activació de la fosfo-inositol-3-quinasa o PI3K que activa la PKB (proteïna quinasa B) o Akt (Holst, 1998). L'activació de l'Akt es correlaciona amb la

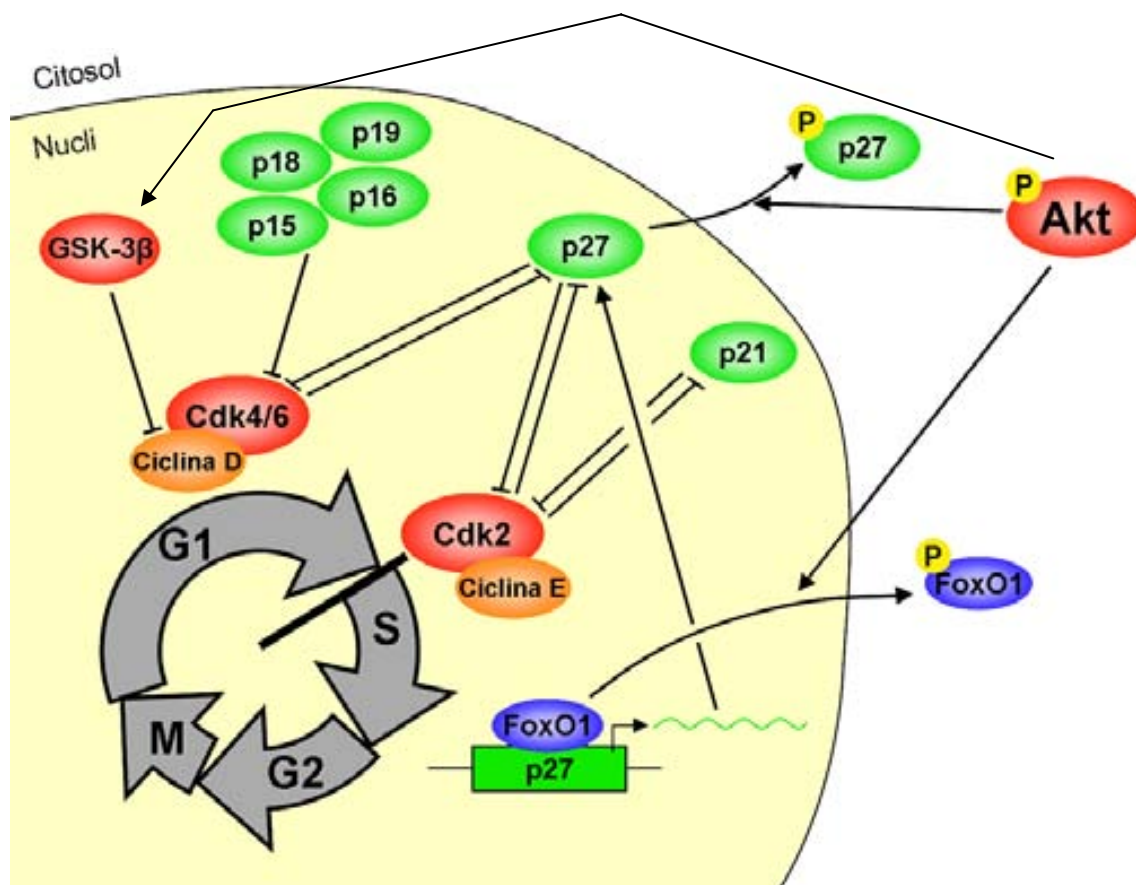
inducció de replicació i de supervivència de les cèl·lules β . Així, la sobreexpressió d'Akt a les cèl·lules β de ratolins transgènics disminueix l'apoptosi i incrementa el tamany de les cèl·lules β (Bernal-Mizrachi, 2001; Tuttle, 2001).

L'efecte anti-apoptòtic d'IGF-I a la cèl·lula β és mitjançant, doncs, l'activació d'Akt, (Kauffmann-Zeh, 1997), que actua fosforilant i inactivant Bad (Datta, 1997), un membre de la família de proteïnes pro-apoptòtiques Bcl-2. L'efecte mitòtic d'IGF-I sobre les cèl·lules β també és a través de l'activació d'Akt (Holst, 1998). A més, la glucosa també pot induir la proliferació de les cèl·lules β en cultiu a través de l'activació d'aquesta via PI3K-Akt i d'un increment en IRS-2 (Paris, 2003; Lingohr, 2006).

La cascada de senyalització IGF-I/IGF-IR/PI3K/Akt té com a una de les dianes principals el factor de transcripció FoxO1 (FKHR). Així, la via de l'Akt-PI3K porta a la fosforilació i, com a conseqüència, l'exclusió nuclear del factor FoxO1, regulant la funció de la cèl·lula β i el seu creixement (Kitamura, 2007). El factor FoxO1 pertany al grup de proteïnes anomenades FoxO que són una subclasse de la gran família de factors de transcripció FOX (Forkhead box proteins). En mamífers n'existeixen quatre tipus: FoxO1, FoxO3, FoxO4 i FoxO6. Aquests factors són regulats a nivell de la seva expressió i per degradació de la proteïna i, sobretot, per fosforilació, la qual determina la localització subcel·lular. La proteïna FoxO1 nuclear pot regular l'expressió de determinats gens actuant com a co-activador de factors de transcripció o, pot inhibir l'expressió d'altres gens competint amb els activadors de la transcripció per la unió al DNA. La supressió gènica d'un dels dos al·lels de FoxO1 és capaç de restablir la proliferació de les cèl·lules β en els animals IRS2^{-/-} (Kitamura, 2002). De la mateixa manera, en models animals amb una replicació de les cèl·lules β incrementada, l'expressió d'una forma de FoxO1 que es troba constitutivament al nucli porta a la disminució de la proliferació de la cèl·lula β (Okamoto, 2006). Tots aquests resultats demostrarien la importància de FoxO1 en la cascada de senyalització de l'IGF-I.

La via Akt-PI3K, a través de la inactivació de FoxO1, regula la proliferació de la cèl·lula β per diferents vies. Una d'elles seria probablement per la disminució de Pdx-1. Aquest factor de transcripció és un dels principals de les cèl·lules β i en regula la seva funció i creixement. Sembla que FoxO1 i Pdx-1 s'exclouren mútuament del nucli (Kawamori, 2006) o bé, FoxO1 podria actuar com un repressor de la transcripció de Pdx-1 per competència amb el factor de transcripció HNF-3 β (FoxA2) que actua com a inductor (Kitamura, 2002). Per altra banda, la

proteïna FoxO1 inhibeix també la proliferació cel·lular a través de la inducció de l'expressió de determinats inhibidors del cicle cel·lular, com el p27^{kip1} (Medema, 2000).



Esquema 7. Representació esquemàtica del paper de l'Akt sobre el control de la maquinària del cicle cel·lular. La unió del lligand IGF-I amb el seu receptor porta a la fosforilació i activació de l'AKT (PKB). La quinasa Akt actua fosforilant l'inhibidor del cicle p27, induint la seva translocació fora del nucli. A més, Akt fosforila el factor de transcripció FoxO1, induint també la seva translocació a fora del nucli i, per tant, deixa d'activar l'expressió de p27. A més, la fosforilació de la GSK-3β permet l'expressió de les ciclines D.

5.1.3. Animals transgènics que expressen IGF-I en cèl·lules β pancreàtiques (RIP-I/IGF-I).

En el nostre laboratori s'havien generat animals transgènics que sobreexpressen IGF-I murí específicament en cèl·lules β pancreàtiques sota el control del promotor del gen de la insulina I de rata (RIP-I) (George, 2002). En primer lloc es va estudiar si la sobreexpressió d'IGF-I era capaç de regenerar el pàncrees endocrí després de la inducció de diabetis experimental mitjançant el tractament amb estreptozotocina (STZ). Els ratolins controls tractats amb STZ desenvolupaven una elevada hiperglicèmia, hipoinsulinèmia, pèrdua de pes i acabaven morint.

Per contra, els ratolins transgènics tractats amb STZ desenvolupaven hiperglicèmia, hipoinsulinèmia, polidípsia i polifàgia però gradualment normalitzaven tots aquests paràmetres i sobreviuen. Mitjançant el marcatge de cèl·lules β en proliferació amb BrdU, es va demostrar que la reversió del fenotip diabètic era deguda a una recuperació de la massa de cèl·lula β , principalment a través de la replicació de les cèl·lules β (George, 2002).

Posteriorment es va demostrar que la sobreexpressió d'IGF-I era, a més, capaç de contrarrestar una diabetis autoimmune. Es van creuar els ratolins RIP-I/IGF-I amb els ratolins transgènics RIP-I/IFN- β , també generats en el nostre laboratori. Els ratolins RIP-I/IFN- β , que sobreexpressen IFN- β humà als illots, mostren insulitis i una major susceptibilitat a desenvolupar diabetis, de manera que amb una dosi de STZ no diabetogènica per ratolins controls, els animals RIP-I/IFN- β esdevenen diabètics. En els dobles transgènics IGF-I/IFN- β , s'observà que IGF-I era un important factor anti-inflamatori ja que disminuïa la insulitis i, després del tractament amb STZ bloquejava l'apoptosi i la pèrdua de massa de cèl·lules β (Casellas, 2006).

En conclusió, els estudis anteriors suggereixen que l'expressió d'IGF-I en el pàncrees de pacients diabètics, tant tipus 1 com 2, podria induir la replicació de les cèl·lules β i permetre la recuperació de la massa de cèl·lula β . A més, alhora podria protegir aquestes cèl·lules β contra l'apoptosi i la insulitis o la inflamació. No obstant, no es coneix els mecanismes pels quals IGF-I és capaç de regenerar el pàncrees endocrí. Així, pel seu possible ús com a teràpia, es requeriria aprofundir en el coneixement dels mecanismes pels quals IGF-I indueix aquesta regeneració dels illots. Per altra banda, la caracterització d'aquests mecanismes podria també ajudar a la identificació d'altres gens clau en la regulació i el creixement de la massa de cèl·lula β i permetre el descobriment de noves dianes terapèutiques per la diabetis.

Així doncs, en aquest treball es van utilitzar els ratolins RIP-I/IGF-I, per tal d'examinar els mecanismes que pels quals l'IGF-I podia regenerar la massa de cèl·lula β després de la inducció de diabetis experimental mitjançant el tractament amb STZ.

5.2. Factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF).

El factor de creixement de l'endoteli vascular A (VEGF-A), també anomenat VEGF, pertany a una família de gens implicats en processos d'angiogènesi i limfogènesi. D'altres membres d'aquesta família, amb els quals conserva una important homologia, són PlGF (*Placental Growth Factor*), VEGF-B, VEGF-C i VEGF-D (Carmeliet; 2003; Ferrara, 2005).

5.2.1. Acció biològica i funció del VEGF.

VEGF és el factor principal en la regulació positiva de la formació dels vasos durant el desenvolupament embrionari (per vasculogènesi i angiogènesi) i, també durant la vida adulta (per angiogènesi), tant en condicions fisiològiques com patològiques. La vasculogènesi és el procés de formació de vasos *de novo* a partir de les cèl·lules precursors de les cèl·lules endotelials (angioblasts) i té lloc durant el període pre-natal, mentre que l'angiogènesi és el creixement i formació de vasos a partir d'altres pre-existents (Carmeliet, 2003, Carmeliet, 2005; Ferrara, 2005).

VEGF és un factor de creixement específic per les cèl·lules endotelials i pels angioblasts, en els que indueix la proliferació, inhibeix l'apoptosi i té efectes quimiotàctics. A les cèl·lules endotelials també hi indueix la formació de fenestracions (Roberts, 1995) i controla el seu gruix per regular el lumen dels vasos produint vasodilatació (Ku, 1995).

No obstant, també s'han descrit efectes mitogènics i quimiotàctics en uns pocs tipus cel·lulars no-endotelials que són les cèl·lules de l'epiteli pigmentari de la retina (Guerrin, 1995), les cèl·lules epitelials dels ductes pancreàtics (Obergh-Welsh, 1997), els monòcits/macròfags (Sawano, 2001), les cèl·lules de Schwann (Sondel, 1999; Storkebaum E, 2004), els mio blasts o precursors de fibres musculars (Arsic N, 2004) i els pneumòcits (Compernelle V, 2002). Així, altres efectes de VEGF són promoure la supervivència, la proliferació i la migració de les cèl·lules de Schwann (Storkebaum E, 2004), reclutar macròfags (Celletti, 2001) o incrementar la replicació de les cèl·lules de l'epiteli ductal del pàncrees (Obergh-Welsh, 1997; Rooman, 1997).

5.2.2. Isoformes del gen VEGF.

El gen VEGF (14Kb), tant humà com de ratolí, està organitzat en 8 exons i 7 introns (Tischer, 1991). Aquest gen dóna diferents isoformes mitjançant *splicing* alternatiu. En el ratolí s'han trobat tres isoformes diferents: VEGF₁₂₀ (a la que li falten els exons 6 i 7), VEGF₁₆₄ (a la que li falta l'exó 6) i VEGF₁₈₈, tenint cadascuna 120, 164 i 188 aminoàcids (Tischer, 1991).

La isoforma 164 és la majoritària i la que té una major activitat biològica. Es tracta d'una glicoproteïna bàsica homodimèrica de 46KDa (23KDa cada monòmer), que és principalment secretada, però que té, també, capacitat d'unió a l'heparan-sulfat de la matriu extracel·lular, de manera que en queda una fracció retinguda (Houck, 1992). La isoforma 120 és totalment difusible i no és tan activa com la 164. En canvi, la 188 queda retinguda a la matriu extracel·lular, on s'hi manté inactiva. No obstant, les proteases heparinasa i plasmina poden alliberar aquesta isoforma, mitjançant la seva digestió que dóna un pèptid de 110 aminoàcids, anomenat VEGF₁₁₀, que sí és actiu (Park, 1993).

Per tal de discernir les diferències en la funció i l'activitat de cada isoforma, es van obtenir tres models diferents de ratolí manipulats genèticament, tots amb el gen VEGF inactivat i cadascun amb un transgèn que expressa exclusivament una sola isoforma. Els estudis dels efectes de cada isoforma en la vascularització d'aquests animals es van dur a terme a les retines. Així, els animals que només expressen la isoforma 120, presenten la vascularització de la retina totalment alterada, sobretot en la diferenciació de les arterioles; els que expressen només la 188 mostren les venes de la retina ben formades, però amb arterioles aberrants. En canvi, els vasos de les retines del ratolí que només expressa la isoforma 164 (VEGF₁₆₄) són normals (Stalmans, 2002). Per tant, sembla que la isoforma amb un espectre més ampli d'acció seria la 164.

5.2.3. Localització i regulació de l'expressió de VEGF.

Una expressió descontrolada de VEGF pot portar a diverses patologies: tumors, inflamació, hipòxia, etc. Per aquest motiu, ha d'estar finament regulada. Així, la transcripció té lloc ràpidament en resposta a un estímul inductor. A més, el mRNA de VEGF té una vida mitja curta, fet que permet la seva ràpida degradació quan acaba l'estímul inductor (Ferrara, 2005).

En un individu adult, en condicions fisiològiques, VEGF s'expressa en els glomèruls renals, a l'epiteli visceral, en els plexus coroideus, a hepatòcits, a cèl·lules alveolars del pulmó, a les glandules adrenals i als illots de Langerhans. És a dir, s'expressa en òrgans on la permeabilitat microvascular és elevada i, principalment, a les cèl·lules adjacents a un endoteli fenestrat (Ferrara, 1994; Carmeliet, 2003, Carmeliet, 2005; Ferrara, 2005).

En condicions no fisiològiques, VEGF s'expressa en cèl·lules tumorals, i en qualsevol tipus cel·lular durant períodes hipòxia, hipoglucèmia o durant un procés d'inflamació. Així, l'expressió de VEGF és induïda per:

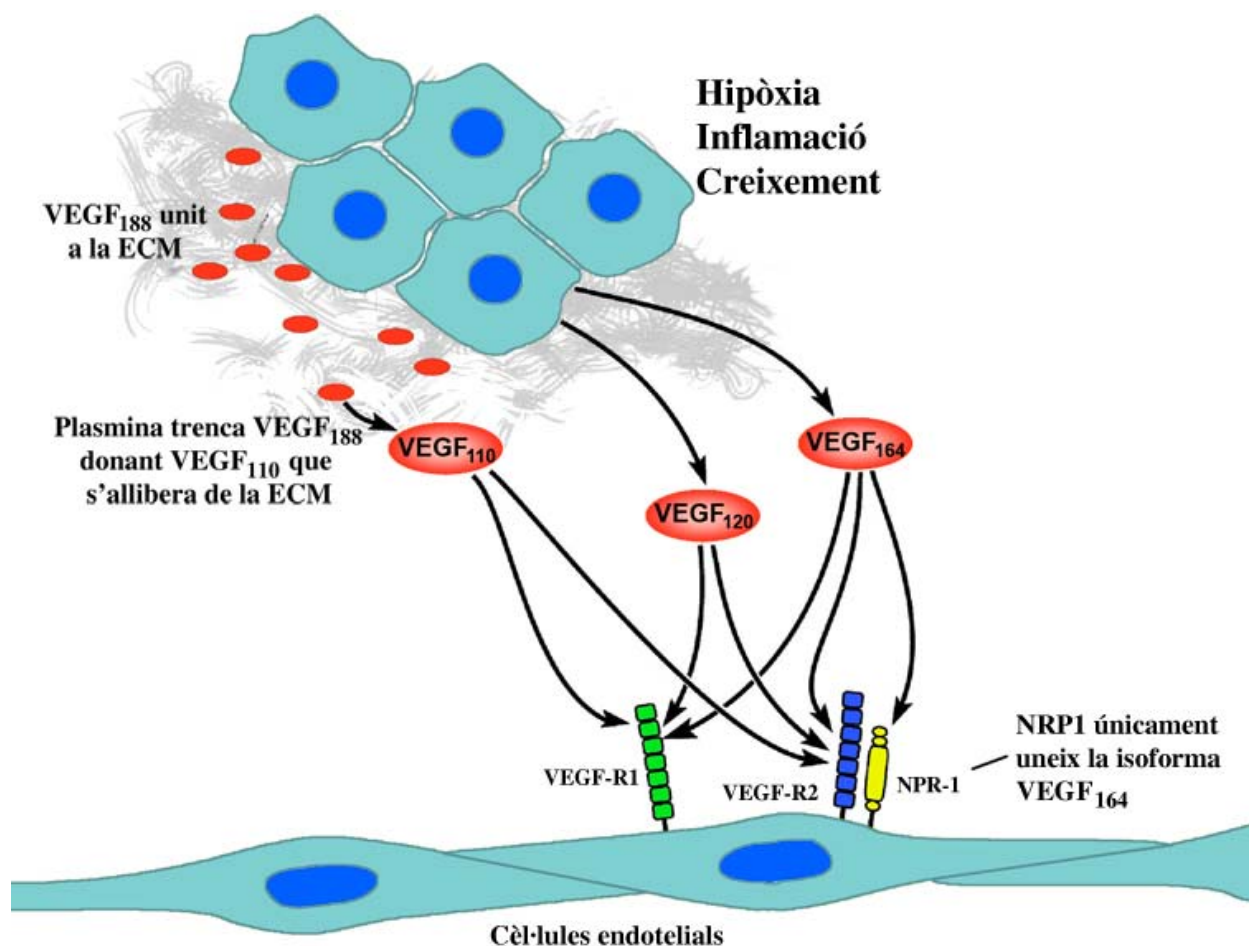
- 1) Hipòxia: una baixa pressió de O₂ incrementa la vida mitja del factor de transcripció anomenat Factor Induïble per Hipòxia (HIF-1 α), ja que evita la seva degradació als proteasomes. Aquest factor incrementa la transcripció de VEGF (Minchenko, 1994).
- 2) Citoquines i factors de creixement: s'ha descrit que tenen un efecte positiu sobre l'expressió de VEGF, les citoquines TGF- β , IL-1 β , IL-6, i els factors de creixement EGF, PDGF, FGF, KGF i sobretot, IGF-I (Ferrara, 1997; Neufeld, 1999).
- 3) Hipoglucèmia.

5.2.4. Estructura i funció biològica dels Receptors de VEGF.

Totes les isoformes de VEGF-A (120, 164 i 188) són reconegudes per dos receptors diferents, ambdós amb activitat tirosina-quinasa. Aquests receptors són coneguts com a VEGFR-1 (*flt-1*) i VEGFR-2 (*flk-1*) (Neufeld, 1994; Carmeliet, 2003, Carmeliet, 2005; Ferrara, 2005). VEGFR-2 és el principal mediador de l'acció biològica de VEGF, activant respostes mitogèniques, quimiotàctiques i antiapoptòtiques a les cèl·lules endotelials (Matsumoto, 2001). La seva acció està mediada per la cascada de senyals que inclou la PI3K i l'Akt i, les proteïnes anti-apoptòtiques Bcl-2 i A1 (Gerber, 1998). Contràriament a VEGFR-2, el VEGFR-1 té una dèbil capacitat de fosforilació, de manera que en unir la molècula de VEGF, pot tenir un efecte negatiu, ja que segresta el VEGF i el manté unit a un receptor de baixa activitat (Guille, 2000).

A més, s'ha descrit un co-receptor anomenat Neuropilina (NPR-1) que s'expressa sempre juntament al VEGFR-2 i actua incrementant l'afinitat del lligand per aquest receptor i, per tant,

la senyal d'activació (Soker, 1998). La NRP-1 reconeix exclusivament la isoforma 164 i això explica, la major activitat biològica de la isoforma VEGF₁₆₄ respecte la resta d'isoformes.



Esquema 8. Esquema de les tres isoformes de VEGF representant les seves característiques d'unió a matriu extracel·lular i de reconeixement dels diferents ceptors de VEGF. La isoforma 121 és difusible i s'uneix als receptors VEGFR-1 i VEGFR-2; la isoforma 188 s'uneix a la matriu extracel·lular i s'allibera per acció de la proteasa plasmina en forma d'un pèptid de 110 aminoàcids que és actiu, s'uneix també a VEGFR-1 i VEGFR-2; la isoforma 164 queda només parcialment retinguda a l'ECM i és la única que s'uneix a VEGFR-1 i VEGFR-2 juntament al co-receptor Neuropilina-1 que incrementa l'activitat del VEGFR-2 (Adaptat de Ferrara, 2005).

5.2.5. Paper del VEGF en la formació i creixement del sistema vascular: vasculogènesi i angiogènesi.

A l'embrió, té lloc la formació de la vascularització, primerament, pel procés de vasculogènesi. En aquest procés, els angioblasts formen una xarxa primitiva de capil·lars, que creix formant vasos que es perllonguen i ramifiquen pel procés d'angiogènesi. En els nous canals formats per cèl·lules endotelials aquestes adquireixen aviat un destí arterial o venós i són ràpidament recobertes per pericits o per cèl·lules musculars llises que permeten la regulació de la perfusió sanguínia (Carmeliet, 2005; Ferrara, 2005).

A l'adult, els vasos es formen sempre com a petits capil·lars a partir de vasos ja existents pel procés d'angiogènesi. Les cèl·lules endotelials que formen un nou capil·lar creixen des del vas pre-existent i emeten uns pseudopodes, formant una expansió massissa que després donarà un tub buit. Durant la vida adulta, la majoria de vasos es mantenen quiescents i l'angiogènesi fisiològica té lloc només en ovaris i placenta. No obstant, en tot el sistema vascular adult, les cèl·lules presenten la capacitat de divisió cel·lular i de migració en resposta a determinats estímuls, d'aquesta manera les cèl·lules endotelials generen nous vasos per tal d'irrigar teixits en creixement i/o en reparació (Carmeliet, 2003; Carmeliet, 2005; Ferrara, 2005). Aquest procés ha d'estar finament regulat, ja que un desequilibri pot donar lloc a desordres tumorals, inflamatoris, immunes, isquèmics i infecciosos.

El procés d'angiogènesi és induït per diversos factors i el principal és el VEGF. En primer lloc, les cèl·lules endotelials que responen a l'estímul han d'obrir-se pas a través de la membrana basal dels vasos ja existents i per fer-ho secreten les metal·loproteïnases MMP-2 i la MMP-9 (Wang, 1998; Visse, 2003). A continuació han de respondre a una senyal quimiotàctica (normalment un gradient de VEGF) i migrar cap al lloc on es requereix el nou vas. Un cop allà, les cèl·lules endotelials han de proliferar i, per últim, han de formar un conducte que doni la nova vascularització (Unemori, 1992; Carmeliet, 2003, Carmeliet, 2005; Ferrara, 2005).

La formació de vasos és un procés complex que requereix d'un delicat equilibri entre nombroses senyals estimuladores i inhibidores com els factors VEGF, PDGF, angiopoietines, quemoquines, sensors d'oxigen, etc., de manera que és un procés altament regulat (Carmeliet, 2003, Carmeliet, 2005; Ferrara, 2005).

5.2.6. Paper de l'endoteli en el desenvolupament i la formació d'òrgans i teixits.

El desenvolupament d'un òrgan així com un procés de regeneració requereix d'una angiogènesi paral·lela que formi la vascularització per irrigar i mantenir el teixit en creixement. L'endoteli subministra senyals (factors de creixement, citoquines...) pel desenvolupament d'òrgans i la diferenciació de cèl·lules i teixits (Ondine, 2003). L'estreta interacció entre els vasos i les cèl·lules del teixit permet el desenvolupament coordinat de l'òrgan i la seva vascularització. Els vasos de cada òrgan tenen característiques pròpies, importants per la seva funció, que són degudes principalment a les senyals que emeten les cèl·lules dels teixits sobre les cèl·lules endotelials (Lammert, 2003a).

Per altra banda, existeixen evidències que indiquen que les cèl·lules endotelials proveeixen senyals que dirigeixen la formació dels òrgans i teixits en paral·lel a la vascularització, tant durant el desenvolupament com a la vida adulta. Per exemple, s'ha demostrat la importància de les cèl·lules endotelials en el desenvolupament del fetge. El ratolí *knock-out* per VEGFR-2 (*VEGFR-2^{-/-}*) (Shalaby, 1995), mancat de cèl·lules endotelials, no presenta ni migració ni proliferació dels hepatoblasts (precursors dels hepatòcits) per formar el fetge primitiu (Matsumoto, 2001). A més, les cèl·lules endotelials, en resposta a VEGF, produeixen factors mitogènics pels hepatòcits com són HGF i IL-6 (interleucina-6) (Lecouter, 2003). D'aquesta manera, les cèl·lules endotelials del fetge adult indueixen la proliferació i la supervivència dels hepatòcits, principalment després d'un dany.

5.2.7. Paper del VEGF i de l'endoteli en el desenvolupament del pàncrees endocrí.

El pàncrees es forma durant el desenvolupament embrionari a partir de l'endoderm de l'intestí primigeni que forma una protuberància dorsal i una altra ventral que es fusionen. Aquests brots pancreàtics primerencs comencen a ser evidents en el dia 9 (e9) en el desenvolupament del ratolí. A partir de l'epiteli dels conductes pancreàtics apareixen cèl·lules endocrines (per neogènesi) que, posteriorment, migren formant petits grups que s'organitzen per originar els illots de Langerhans (Wessels, 1967; Deltour, 1991). Paral·lelament, els illots són envaïts per vasos sanguinis i fibres del sistema nerviós perifèric (Pickup & Williams, 2003). Just abans de l'evaginació de l'epiteli pancreàtic per formar els brots pancreàtics al dia 8.5 (e8.5) s'indueix l'expressió del factor de transcripció pancreàtic Pdx-1. Es mantenen uns nivells alts

d'expressió de Pdx-1 fins e10.5, posteriorment, l'expressió es redueix i acaba limitant-se a les cèl·lules β i δ .

Durant el desenvolupament embrionari, la diferenciació de les cèl·lules β productores d'insulina a partir de l'epiteli dels ductes pancreàtics requereix la presència de les cèl·lules endotelials dels grans vasos del pàncrees. Així, els animals transgènics Pdx-1/VEGF sobreexpressen VEGF al pàncrees des del dia e8.5, produint un increment en la vascularització de l'òrgan. L'increment en la quantitat d'endoteli indueix un augment de tres vegades en el nombre d'illots, gràcies a un increment en el nombre de vasos i, conseqüentment, en les senyals que emeten les cèl·lules endotelials que activen la formació d'illots (Lammert, 2001). Amb estudis posteriors mitjançant explants, s'ha demostrat que són les senyals que emeten les cèl·lules endotelials de l'aorta dorsal les que indueixen la diferenciació de les cèl·lules endocrines dels illots, gràcies, principalment, a la inducció de l'expressió del factor de transcripció Ptf1a (Yoshitomi, 2004). Aquest factor de transcripció permet l'expressió d'altres gens implicats en la diferenciació de les cèl·lules endocrines dels illots. Més tard en el desenvolupament, quan les cèl·lules β s'agreguen per formar illots comencen a expressar VEGF en grans quantitats per atreure les cèl·lules endotelials que han de formar els capil·lars dels illots pancreàtics (Inoue, 2002). Els ratolins manipulats genèticament, que tenen el gen VEGF inactivat en les cèl·lules β , presenten illots amb una deficient vascularització (Lammert, 2003b). Així doncs, la vascularització del pàncrees té lloc en dues onades: primerament es produeix VEGF a l'endoderm i es formen els grans vasos del pàncrees, els quals emeten senyals per induir la diferenciació dels illots. Llavors, els illots formats secreten més VEGF, que indueix el desenvolupament de la vascularització pròpia dels illots (Lammert, 2003a).

Per tant, VEGF, com a principal factor vasculogènic i angiogènic, és necessari pel desenvolupament del pàncrees, ja que indueix la formació dels vasos. No obstant, també hi està implicat directament, ja que indueix el creixement dels conductes pancreàtics. Les cèl·lules dels ductes expressen VEGFR-2 i, el VEGF n'és un dels principals factors mitogènics (Rooman, 1997). Així, VEGF s'expressa a nivells alts en el pàncrees embrionari i indueix tant la formació dels vasos com dels ductes pancreàtics (Obergh-Welsh, 1997). Les cèl·lules β , a l'embrió, es formen a partir de l'epiteli dels ductes per un procés de neogènesi i, per tant, la proliferació de les cèl·lules epitelials dels ductes en seria un pre-requisit necessari.

5.2.8. Paper del VEGF i de l'endoteli en la regeneració i el creixement del pàncrees.

La massa de cèl·lula β no és estàtica, sinó que varia d'acord a les necessitats de secreció d'insulina. Per tant, en incrementar la demanda d'insulina, incrementa la massa de cèl·lula β (Bonner-Weir, 2001). El creixement dels illots ha d'anar acompanyat d'un procés d'angiogènesi per irrigar les noves cèl·lules endocrines de l'illot (Duvillié, 2002; Ballian, 2007). Així, deficiències en la formació de vasos dels illots sembla que seria una de les causes de l'alteració en la secreció d'insulina en les rates Zucker. En aquests animals, té lloc una hiperplàsia dels illots per compensar els requeriments d'insulina, però sense una angiogènesi suficient (Li, 2006). El factor VEGF és el principal responsable de la formació de vasos en els illots, tant durant el desenvolupament embrionari com durant el creixement dels illots a l'edat adulta (Lammert, 2003b; Brissova, 2006)

A més, les cèl·lules β no presenten membrana basal i, per tant, depenen de les cèl·lules endotelials adjacents, per la seva rica matriu extracel·lular per tal de mantenir la proliferació i la funcionalitat de les cèl·lules β (Nikolova, 2006; Nikolova, 2007). S'ha descrit que la laminina de l'ECM activa la transcripció de la insulina i indueix la proliferació de les cèl·lules β (Nikolova, 2006).

En conclusió, l'endoteli vascular dels illots pancreàtics és clau en la regulació de la funcionalitat i la viabilitat dels illots. Per una banda, el creixement de la massa de cèl·lula β requereix d'una major irrigació que arribi a les noves cèl·lules formades i, sense aquesta irrigació, moririen. I, per l'altra banda, les cèl·lules endotelials no només permeten l'arribada d'oxigen i nutrients, sinó que elles directament subministren senyals que promouen la supervivència i la proliferació de les cèl·lules β . A més, la vascularització del pàncrees endocrí determina la secreció de les diferents hormones dels illots. Aquest control es realitza a través de la distribució dels vasos dins l'illot i de la permeabilitat de l'endoteli (induïda per VEGF) que permet l'accés al torrent circulatori.

Així doncs, en aquest treball es va estudiar el paper de l'endoteli vascular dels illots i del factor pro-angiogènic VEGF en la regulació de la massa de cèl·lula β així com en el manteniment de la viabilitat i la funció dels illots.

III. OBJECTIUS

La Diabetis Mellitus, tant tipus 1 com tipus 2, és el resultat d'una deficiència en la funció i la massa de cèl.lula β del pàncrees. Recuperar la massa de cèl.lula β és, per tant, un dels principals reptes de la medicina regenerativa pel tractament de la Diabetis. Així doncs, és necessari conèixer els mecanismes implicats en la regeneració del pàncrees endocrí. En el nostre laboratori, s'havia demostrat que l'expressió local del factor de creixement IGF-I reestablia la massa de cèl.lula β després del tractament amb estreptozotocina (STZ). En aquest treball, ens vam proposar caracteritzar els mecanismes pels quals, l'IGF-I és capaç d'induir la regeneració de la massa de cèl.lula β .

La reversió del procés diabètic requereix, a més de la recuperació de la massa de cèl.lula β , que els illots portin a terme una correcta secreció d'insulina per tal de mantenir l'homeòstasi de la glucosa. Estudis recents han demostrat que l'endoteli vascular dels illots és clau en el control de la secreció d'insulina i en la supervivència i la proliferació de les cèl.lules β . Així, en aquest treball, també es va estudiar el paper del factor pro-angiogènic VEGF i de la vascularització dels illots en la funcionalitat i la viabilitat del pàncrees endocrí.

Per tant, els objectius concrets d'aquest treball han estat els següents:

- 1.** Caracteritzar els mecanismes a través dels quals, l'IGF-I indueix la regeneració del pàncrees endocrí en els ratolins transgènics RIP-I/IGF-I després del tractament amb STZ. Això involucrava:
 - 1.1.** Estudiar la cascada de senyalització del receptor d'IGF-I i el control del cicle cel.lular en illots de ratolins transgènics RIP-I/IGF-I abans i després del tractament amb STZ.
 - 1.2.** Examinar l'efecte de l'IGF-I en la vascularització dels illots dels ratolins transgènics RIP-I/IGF-I.

- 2.** Estudiar el paper del factor VEGF i de l'endoteli vascular en la viabilitat i funcionalitat dels illots pancreàtics. Això involucrava:
 - 2.1.** Obtenir ratolins transgènics que sobreexpressin VEGF en les cèl.lules β pancreàtiques (RIP-I/VEGF).
 - 2.2.** Estudiar l'efecte de VEGF i de les cèl.lules endotelials en la regulació de la massa de cèl.lula β i en la morfologia dels illots.
 - 2.3.** Caracteritzar l'efecte de l'endoteli dels illots i del VEGF en la funció del pàncrees endocrí, així com la seva implicació en el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa.

IV. RESULTATS

***PART I: ESTUDI DELS MECANISMES PELS
QUALS IGF-I INDUEIX LA REGENERACIÓ
DEL PÀNCREES ENDOCRÍ.***

La Diabetis Mellitus tipus 1 i la tipus 2 apareixen com a conseqüència d'una disminució de la massa i la funció de la cèl.lula β , de manera que els deficients nivells d'insulina no poden compensar-ne la demanda. Per tant, pel seu tractament es requeriria el reestabliment de la massa de cèl.lula β i la seva funció, de manera que fós capaç de mantenir l'homeòstasi de la glucosa. Així doncs, seria necessari conèixer els mecanismes implicats en el manteniment i l'expansió de la massa de de cèl.lula β .

S'han descrit diversos factors amb activitat mitogènica i anti-apoptòtica per la cèl.lula β , d'entre ells caldria destacar l'IGF-I. En el nostre laboratori, s'havia demostrat que l'expressió de l'IGF-I a les cèl.lules β pancreàtiques de ratolins transgènics (RIP-I/IGF-I) era capaç de regenerar el pàncrees endocrí després del tractament amb estreptozotocina (STZ) (George, 2002). Els ratolins transgènics RIP-I/IGF-I esdevenien diabètics després del tractament, però gradualment recuperaven els paràmetres metabòlics així, com una massa de cèl.lula β normal. Per tant, l'expressió local *in vivo* d'aquest factor induïa un procés de regeneració de la massa de cèl.lula β . Així, seria d'interès caracteritzar els mecanismes mitjançant els quals, l'IGF-I era capaç de recuperar i mantenir la massa de cèl.lula β en aquests animals. En la **Part I** d'aquest estudi, es va examinar la capacitat del factor IGF-I de protegir i induir la replicació de la cèl.lula β , així com les vies moleculars implicades en aquest procés.

1. ESTUDI DEL METABOLISME DESPRÉS DE LA INDUCCIÓ DE DIABETIS EXPERIMENTAL MITJANÇANT EL TRACTAMENT AMB STZ (5 x 40 mg/kg).

Es va induir diabetis experimental a un grup de ratolins controls i transgènics RIP-I/IGF-I mascles de 8 setmanes d'edat, en un fons genètic C57Bl6/SJL. Els animals van ser injectats intraperitonealment un cop al dia amb una dosi de 40 mg/Kg de STZ durant 5 dies consecutius. En aquesta soca de ratolí utilitzada, aquest tractament indueix la mort de les cèl·lules β i porta al desenvolupament de diabetis, encara que sense insulinitis (Like & Rossini, 1976; O'Brien, 1996).

1.1. Seguiment de la glucèmia i la insulinèmia després del tractament amb STZ.

Es va dur a terme un seguiment de la glucèmia en els animals controls i transgènics després del tractament amb STZ. La determinació es realitzava sempre en estat d'alimentació i a primera hora del matí. La primera mesura es va prendre el dia 1 de l'experiment, just abans de la primera injecció de STZ. En aquest moment no es van observar diferències significatives entre els valors de glucèmia dels animals controls i transgènics (Figura 1). Un mes després del tractament, els animals controls van desenvolupar hiperglucèmia ràpidament, arribant a valors propers a 500 mg/dl. Els ratolins transgènics, també van mostrar hiperglucèmia durant el primer mes, arribant a valors al voltant de 300 mg/dl. No obstant, aquesta hiperglucèmia no va arribar mai a ser tan elevada com en els animals controls. Un mes després del tractament, la hiperglucèmia dels ratolins transgènics disminueix progressivament, fins a normalitzar-se en el tercer mes després del tractament.

Tres mesos després del tractament, es va determinar la concentració sèrica d'insulina. Paral·lelament, es va realitzar la mateixa determinació en ratolins controls i transgènics no tractats amb STZ de la mateixa edat. Es va observar que la hiperglucèmia dels animals controls tractats amb STZ anava acompanyada d'una insulinèmia significativament inferior a la dels animals no tractats. En canvi, la insulina circulant en els ratolins transgènics tractats amb STZ era unes tres vegades superior respecte els controls tractats i, no era estadísticament diferent de la insulinèmia en els animals sans no tractats (Figura 2).

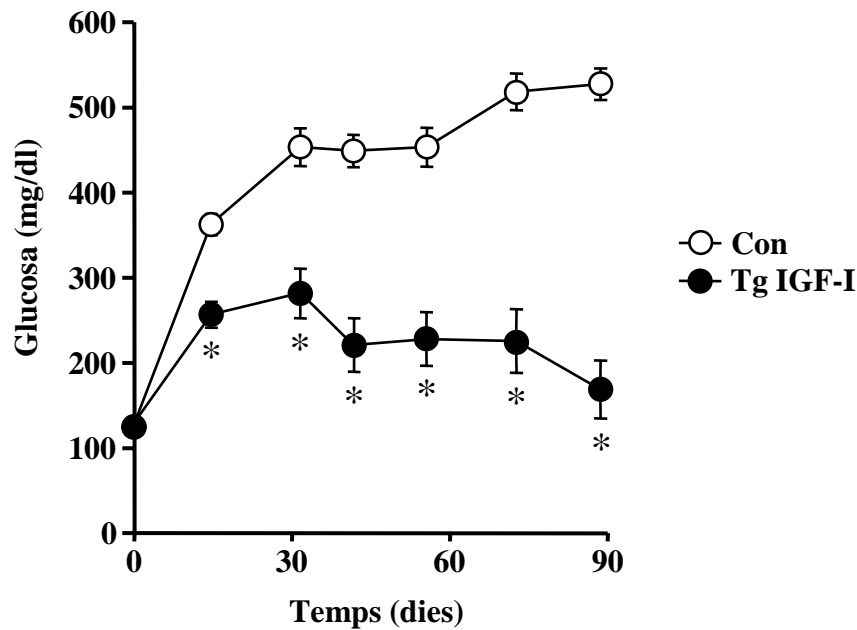


Figura 1. Evolució de la glucèmia en els ratolins controls i transgènics IGF-I tractats amb STZ. Es van tractar animals controls i transgènics de 8 setmanes d'edat amb STZ (40 mg/kg en 5 injeccions i.p. consecutives) i es van determinar els valors de glucosa en sang en estat d'alimentació, a primera hora del matí, en els dies indicats, mitjançant l'analitzador Glucometer Elite, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja±SEM de 12 animals per grup.

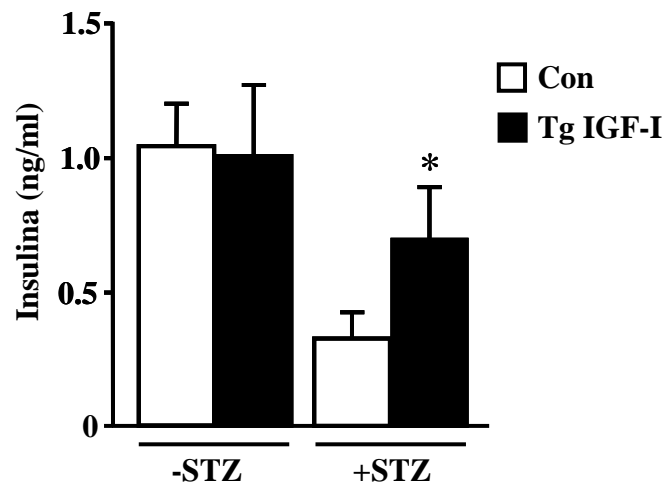


Figura 2. Determinació de la concentració sèrica d'insulina. Es va determinar el nivell d'insulina circulant en els animals controls i transgènics tractats amb STZ, tres mesos després del tractament. En paral·lel es va realitzar la mateixa mesura en animals controls i transgènics de la mateixa edat (5 mesos d'edat). En tots els animals la insulina es va determinar en estat d'alimentació, tal i com s'explica a l'apartat de Materials i Mètodes. Els valors són la mitja±SEM de 8 animals a cada grup experimental.

Així doncs, els ratolins transgènics IGF-I normalitzaven els valors de glucèmia i d'insulinèmia tres mesos després del tractament amb STZ.

1.2. Anàlisi de la tolerància a la glucosa després del tractament amb STZ.

La completa reversió del fenotip diabètic requereix no només una normalització de la glucèmia, sinó també el manteniment de l'homeòstasi de la glucosa enfront d'una sobrecàrrega del sucre. Així, tres mesos després del tractament amb STZ, es va realitzar un test de tolerància a la glucosa (GTT) en els animals controls i transgènics tractats i, animals controls i transgènics sans de la mateixa edat. Els ratolins controls tractats amb STZ van mostrar valors d'hiperglucèmia en dejuni i, després de la injecció del sucre, la glucèmia va arribar al límit de detecció del kit i s'hi va mantenir durant gran part del test, sense arribar a normalitzar-se (Figura 3). Per contra, els animals transgènics IGF-I presentaven una glucèmia en dejú similar a la dels animals sans i, després de la injecció de glucosa, la glucèmia va incrementar i, posteriorment, va disminuir seguint el mateix patró que en els ratolins no tractats amb STZ (Figura 3). Així doncs, els illots dels ratolins transgènics responien correctament en un GTT i eren capaços de mantenir una homeòstasi de la glucosa normal.

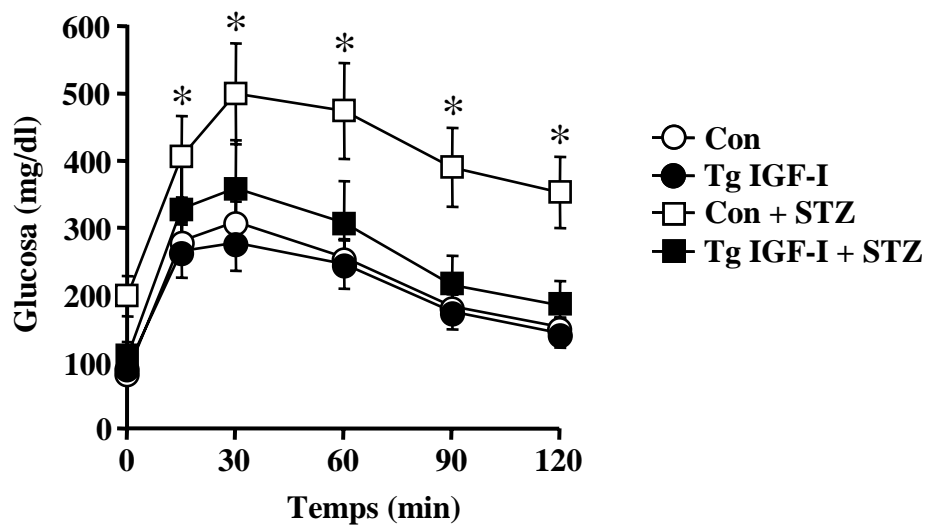


Figura 3. Test de tolerància a la glucosa en animals controls i transgènics IGF-I sans i tractats amb STZ. Es va realitzar un test de tolerància la glucosa 2.5 mesos després del tractament amb STZ. Els animals es van dejunar durant 16 hores i se'ls va injectar una sobrecàrrega de 1g/kg de glucosa. Just abans de la injecció del sucre i 15, 30, 60, 90 i 120 minuts després de la injecció es va mesurar la glucosa en sang, tal i com s'explica a Materials i Mètodes. Els valors són la mitja \pm SEM de 8 animals per grup experimental.

2. ESTUDI DE L'EXPRESSION I LOCALITZACIÓ DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA GLUT-2.

Els ratolins transgènics IGF-I desenvolupaven hiperglucèmia després del tractament amb STZ, però, mai arribaven a valors de glucèmia tan alts com els controls. Aquest resultat podria suggerir una protecció parcial dels illots enfront de la toxicitat del tractament amb STZ. La STZ entra a l'interior de les cèl·lules β exclusivament a través del transportador de glucosa GLUT-2, de manera que una expressió deficient de GLUT-2 podria protegir les cèl·lules β enfront de la STZ (Wang & Gleichmann, 1998). Per tant, a continuació, vam analitzar immunohistoquímicament els nivells de GLUT-2 a la membrana de les cèl·lules β . No es van observar diferències en el marcatge de GLUT-2 entre illots controls i transgènics (Figura 4). Aquest resultat suggeria, doncs, que la protecció parcial enfront de la STZ no era deguda a una disminució de GLUT-2 en els illots transgènics IGF-I.

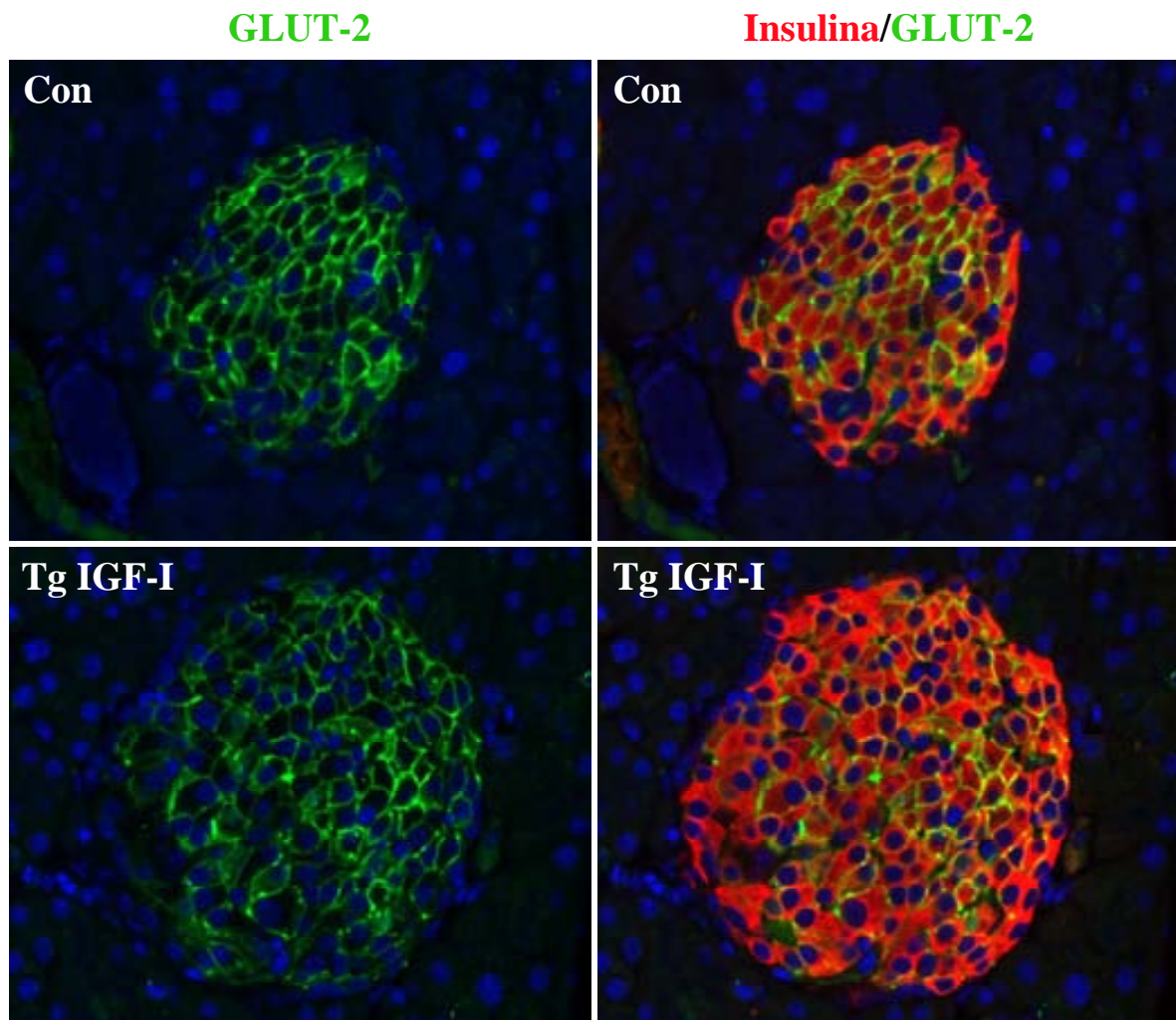


Figura 4. Anàlisi immunohistoquímica de l'expressió i la localització de GLUT-2 en les cèl·lules β . Es va realitzar una doble tinció immunohistoquímica amb anticòs contra GLUT-2 (verd) i contra insulina (vermell) en seccions de pàncrees de ratolins controls i transgènics de dos mesos d'edat, tal i com s'explica a l'apartat de Materials i Mètodes. Ampliació 400x.

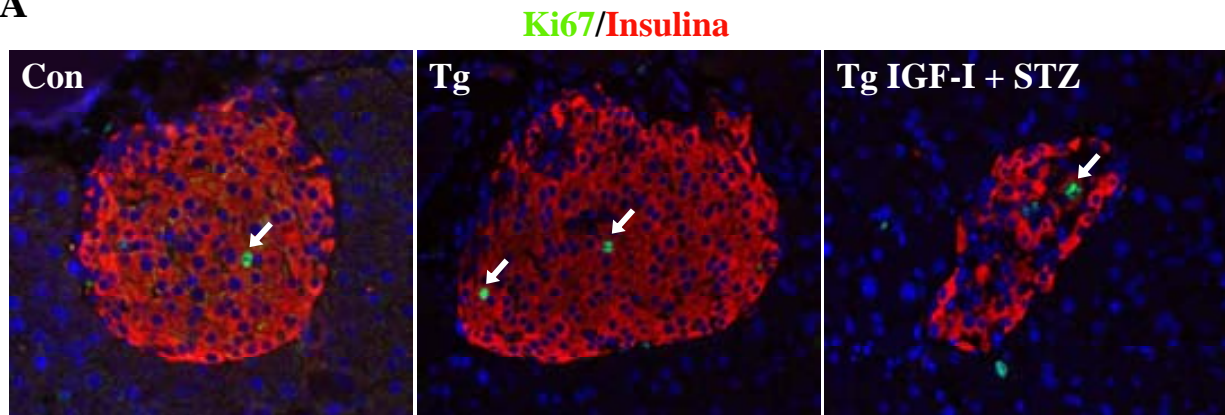
Així doncs, una expressió normal de GLUT-2 juntament a l'aparició d'hiperglucèmia en els ratolins transgènics IGF-I indicava que la STZ entrava a les cèl·lules β pancreàtiques i hi devia produir un efecte tòxic (encara que no fós tan important com en els controls). No obstant, tres mesos després del tractament, la hiperglucèmia revertia i la insulinèmia es normalitzava. Per tant, aquest resultat suggeria que havia tingut lloc un procés de recuperació després del tractament amb STZ.

3. DETERMINACIÓ DE LA TAXA DE REPLICACIÓ DE LES CÈL·LULES β PRE-EXISTENTS DESPRÉS DEL TRACTAMENT AMB STZ.

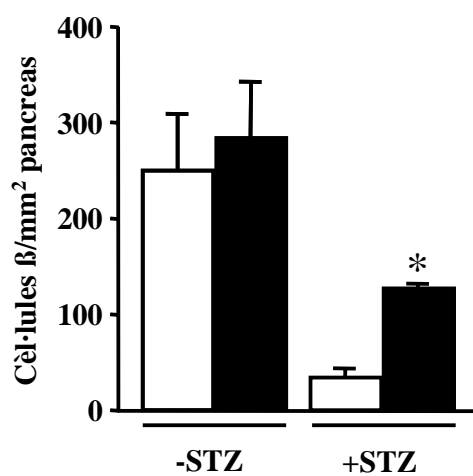
La replicació de les cèl·lules β pre-existents s'ha descrit com el principal mecanisme pel manteniment i creixement de la massa de cèl·lula β (Dor, 2004; Georgia, 2004; Teta, 2007). Així, a continuació, vam mesurar la proliferació de les cèl·lules β després del tractament amb STZ mitjançant una co-tinció contra Ki67, marcador de proliferació (Starborg, 1996), i contra insulina. Aquesta determinació es va realitzar dos mesos després del tractament, quan els ratolins controls mostraven una marcada hiperglucèmia (superior a 500 mg/dl) i els animals transgènics estaven en procés de regeneració i encara no havien normalitzat la seva glucèmia (es mantenien al voltant de 220 mg/dl). Així, vam observar que els animals transgènics després de la STZ mostraven un increment d'unes tres vegades en el nombre de cèl·lules β en proliferació respecte els controls tractats (Figura 5A i B). En canvi, el percentatge de cèl·lules β en replicació en els ratolins transgènics sense tractament amb STZ no era estadísticament diferent al dels animals control (Figura 5A i B).

Dos mesos després del tractament amb STZ, es va determinar el nombre de cèl·lules β per àrea de pàncrees en animals controls i transgènics. Es va realitzar aquesta quantificació enlloc de l'àrea de cèl·lula β per àrea de pàncrees per tal de descartar processos d'hipertrofia. Així, vam observar que els ratolins controls tractats amb STZ mostraven una disminució de més del 70% del nombre de cèl·lules β /àrea de pàncrees respecte els animals sans. En canvi, els pàncrees dels ratolins transgènics tractats amb STZ, mostraven un increment de 4 vegades en la quantitat de cèl·lules β respecte els controls diabètics. Aquest major nombre de cèl·lules β , representava més de la meitat de les cèl·lules β que tenien els animals sans i permetia la disminució de la hiperglucèmia diabètica en els animals transgènics fins a valors propers a la normoglucèmia.

A



B



C

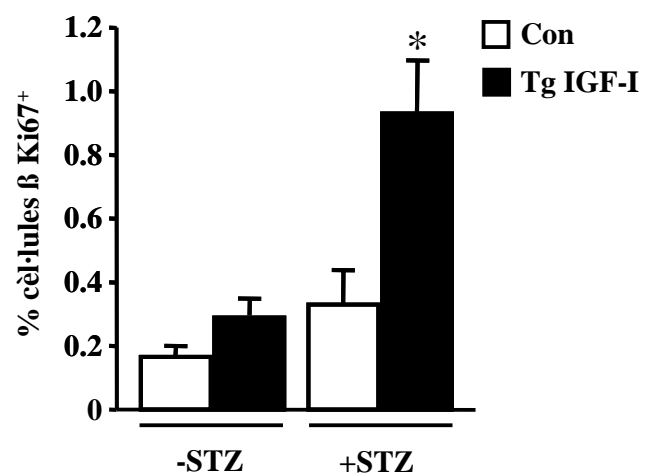


Figura 5. Mesura de la taxa de replicació. A) Anàlisi immunohistoquímica de la replicació. Es va realitzar un doble tinció immunohistoquímica contra Ki67 (verd) i contra insulina (vermell) en talls histològics de pàncrees d'animals controls i transgènics sans de 5 mesos d'edat i en controls i transgènics 2 mesos després del tractament amb STZ, tal i com s'explica a Materials i Mètodes. Ampliació 400x. B) Taxa de replicació. Es varen comptar un mínim de 5000 nuclis de cèl·lula β per animal en diferents talls i un mínim de tres animals per grup. Es va representar com percentatge de cèl·lules β positives per Ki67 sobre el total de cèl·lules β . El resultat és la mitja \pm SEM de quatre animals per grup. * $P < 0,05$. C) Nombre de cèl·lules β /àrea de pàncrees. Es realitzar quatre seccions de pàncrees en tres animals per grup experimental i es van tenyir amb un anticòs anti-insulina. Es van quantificar el nombre total de nuclis envoltats per senyal insulina-positiva i l'àrea de cada tall histològic. El resultat és la mitja \pm SEM de quatre animals per grup. * $P < 0,05$.

Així, la sobreexpressió del factor de creixement IGF-I induïa un increment en la taxa de replicació de les cèl·lules β després d'un dany, donant una recuperació del nombre de cèl·lules β . Això explicaria la normalització dels paràmetres metabòlics en els animals transgènics tres mesos després del tractament amb STZ.

4. EFECTE DE L'IGF-I EN EL CONTROL DEL CICLE CEL·LULAR.

Donat que els illots dels animals RIP-I/IGF-I mostraven un increment en la replicació de les cèl·lules β després del tractament amb STZ, vam caracteritzar el paper de l'IGF-I en la regulació dels components claus del cicle cel·lular en els illots dels animals transgènics abans i després de la inducció de diabetis amb STZ.

Així, es va examinar l'estat d'activació de la cascada de senyalització del receptor d'IGF-I. Amb aquest objectiu es van obtenir extractes de proteïna d'illots de ratolins mascles control i transgènics alimentats de 2 mesos d'edat. Aquests extractes es van utilitzar per la quantificació dels nivells de proteïna de diferents components de la cascada mitjançant Western-blot. En els illots transgènics, es va observar un important increment en els nivells d'Akt fosforilada (P-Akt) (Figura 6A). Aquest resultat indicava que la sobreexpressió d'IGF-I portava a una major activació de la via de la Akt. A més, els illots transgènics mostraven un increment en la quantitat d'Akt total (Figura 6), possiblement degut a una sobreestimulació crònica de la via.

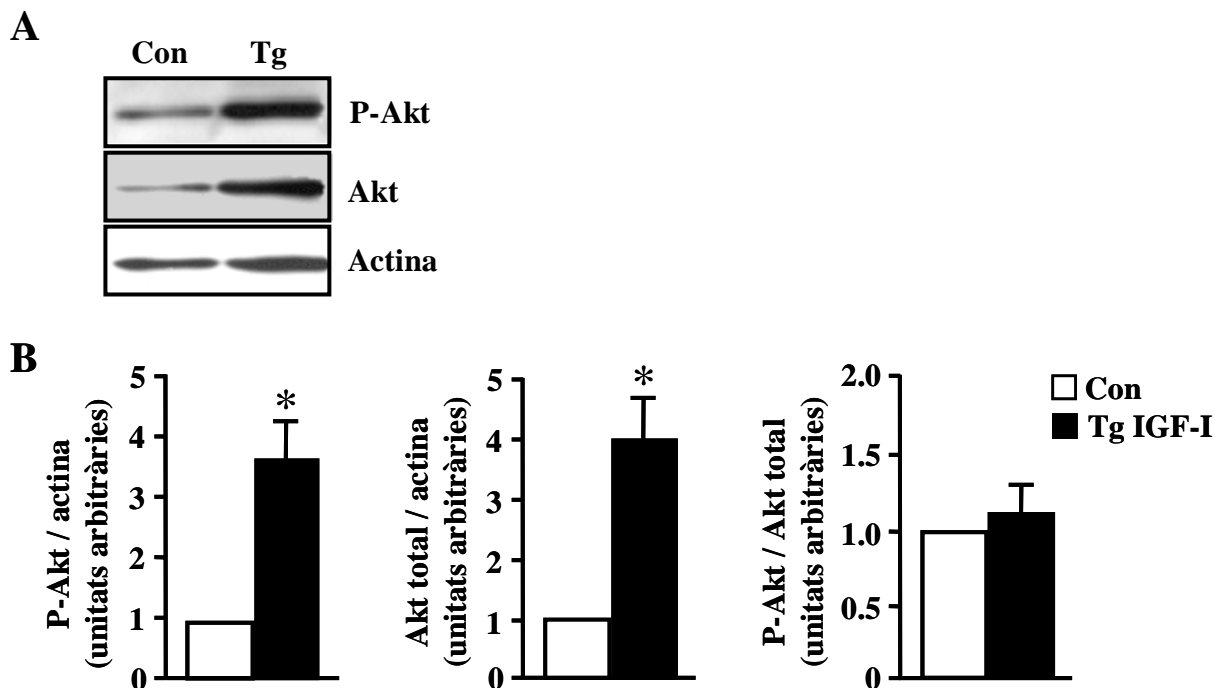


Figura 6. Anàlisi de l'activació de la cascada de senyalització de l'IGF-IR. Determinació dels nivells d'Akt total i P-Akt. Es va determinar la quantitat de proteïna Akt i del seu nivell de fosforilació mitjançant Western-blot d'extractes de proteïna d'illots aïllats de ratolins control i transgènic IGF-I, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els nivells de proteïna total es van normalitzar amb l'expressió d'actina. Tant Akt com P-Akt corresponien a una banda de 60 KDa i, l'actina, a una de 42 Kda. **A)** immunoblot representatiu. **B)** densitometria de tres immunoblots diferents per cada anticòs on el carril control i el transgènic corresponen a extractes de proteïnes de quatre animals per grup. El resultat és la mitja \pm SEM de tres experiments diferents. * $P < 0,05$.

Un dels substractes de la quinasa Akt és el factor de transcripció FoxO1 (Brunet, 1999). El nivell de fosforilació de FoxO1 es va determinar també per Western-blot. L'increment en P-Akt va donar un increment en la fosforilació de FoxO1 (P-FoxO1) però no en FoxO1 total, suggerint una menor activitat del factor de transcripció (Figura 7).

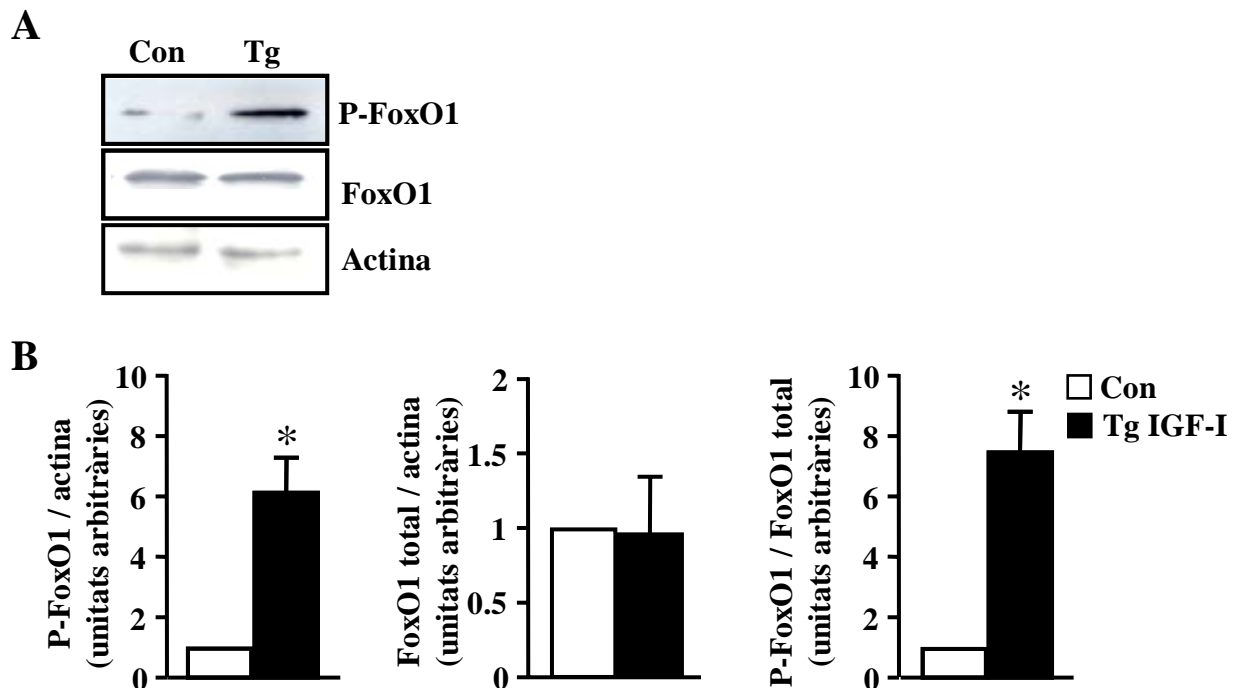


Figura 7. Determinació dels nivells de FoxO1 total i P-FoxO1. Es va determinar la quantitat de proteïna FoxO1 i de P-FoxO1 mitjançant Western-blot, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els nivells de proteïna total es van normalitzar amb l'expressió d'actina. Tant FoxO1 com P-FoxO1 corresponien a una banda de 80 KDa i, l'actina, a una de 42KDa. *Esquerra:* immunoblot representatiu. *Dreta:* densitometria de tres immunoblots diferents per cada anticòs on el carril control i el transgènic corresponen a extractes de proteïnes de quatre animals per grup. El resultat és la mitja±SEM de tres experiments diferents. *P<0,05.

El factor de transcripció FoxO1 inhibeix la replicació cel·lular induint la transcripció de l'inhibidor del cicle cel·lular p27 (Uchida, 2005). En analitzar l'expressió de p27 mitjançant PCR quantitativa, s'observà una disminució del 60% en illots transgènics IGF-I, fet que es correlacionava amb l'increment de la fosforilació i, per tant, amb la disminució de l'activitat de FoxO1 (Figura 8A). A més, s'ha descrit que P-Akt fosforila p27 induint la seva exclusió nuclear (Chiappetta, 2002; Shin, 2002). Així, mitjançant, una doble tinció immunohistoquímica contra p27 i contra insulina es va observar una disminució en els nivells de p27 nuclear als illots transgènics probablement degut a la fosforilació per Akt, juntament a la disminució de l'expressió de p27 (Figura 8B).

L'activació de la Cdk-4 permet la progressió de la fase G₁ i la replicació cel·lular (Rane, 1999; Malumbres, 2005). En realitzar una doble anàlisi immunohistoquímica contra Cdk-4 i insulina, es va comprovar que el marcatge nuclear per Cdk-4 a les cèl·lules β era superior en els illots transgènics que en els controls (Figura 9A). A més, mitjançant Western-blot a partir d'extractes protèics d'illots, es va trobar un increment d'aproximadament dues vegades en l'expressió de Cdk-4 en els animals transgènics (Figura 9B). En els animals transgènics dos mesos després del tractament amb STZ es va observar un increment en el marcatge nuclear de Cdk-4 (Figura 9A), similar al que mostraven les cèl·lules β dels ratolins transgènics sans. Així doncs, tots aquests resultats suggerien una predisposició a la progressió del cycle cel·lular i, per tant, a la replicació de les cèl·lules β en els ratolins transgènics sans i, aquesta predisposició es mantenia després del tractament amb STZ.

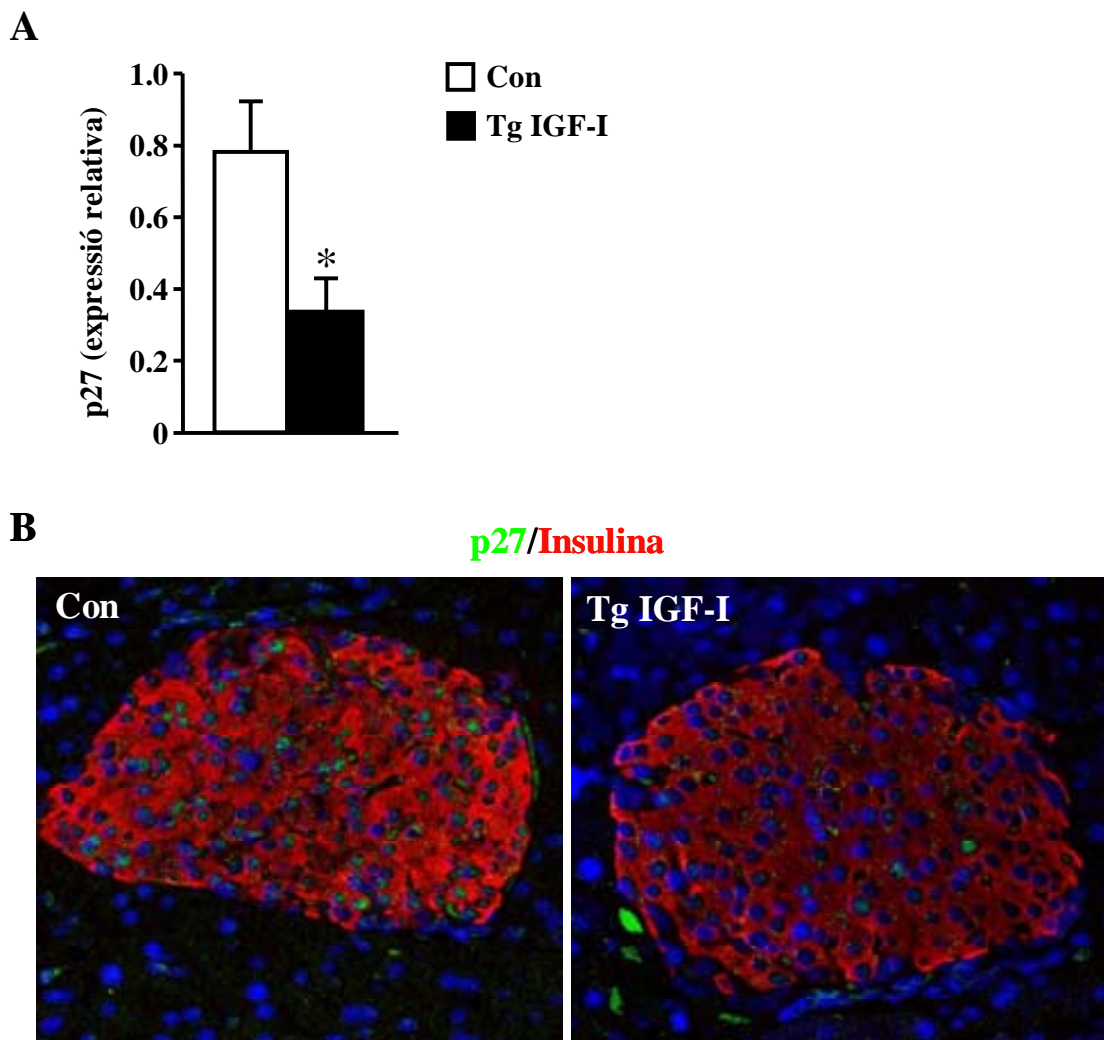
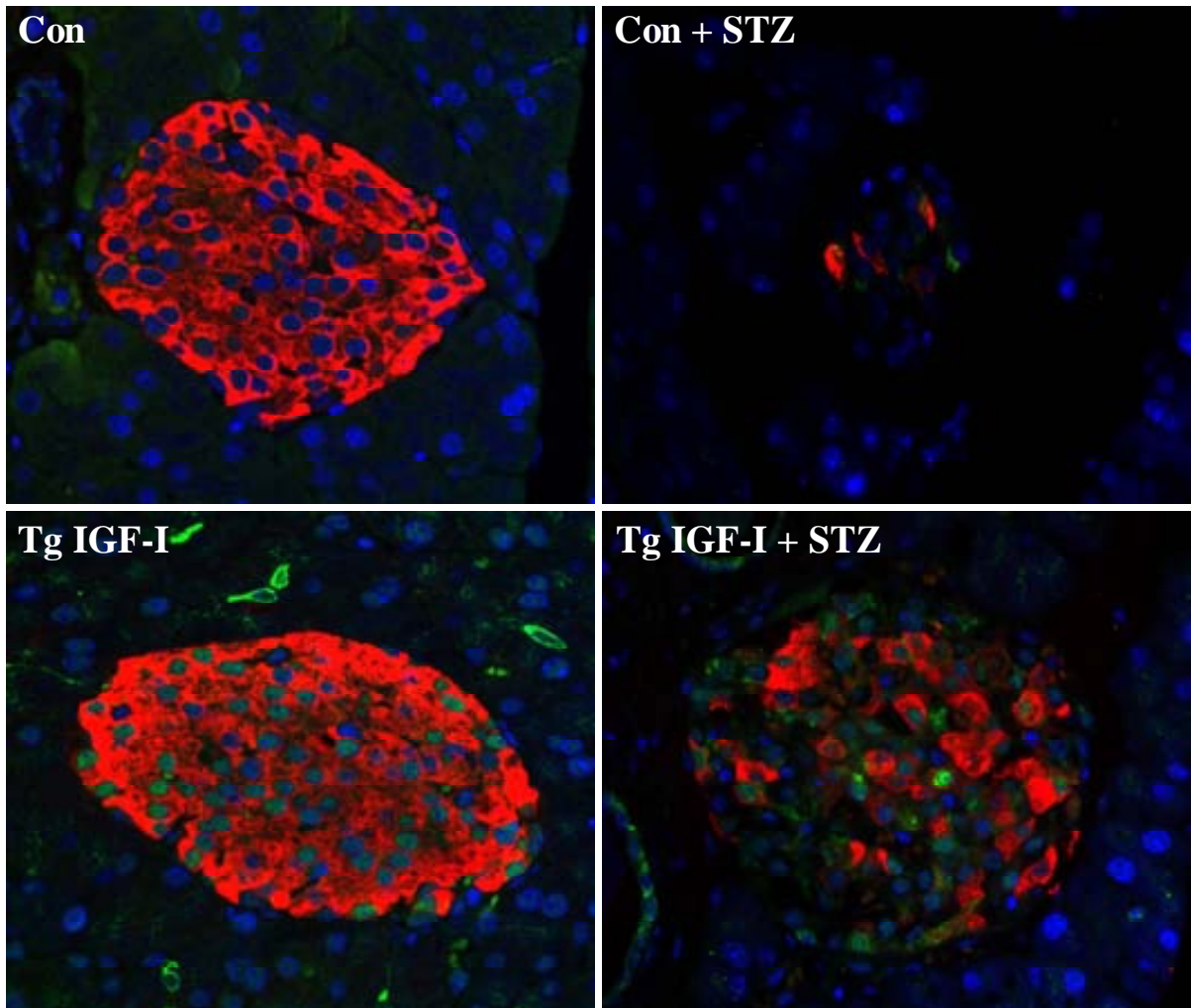


Figura 8. Anàlisi de l'expressió i localització de proteïnes reguladores del cycle cel·lular. A) Expressió de l'inhibidor p27. Es determinà els nivells de mRNA de p27 mitjançant Q-PCR a partir de RNA obtingut d'illots aïllats de ratolins control i transgènics IGF-I de 2 mesos d'edat tal i com s'indica a l'apartat de Materials i Mètodes. El resultat és la mitja ± SEM de tres experiments independents (*p<0,05). **B) Anàlisi immunohistoquímic de p27.** Es va realitzar una doble tinció immunohistoquímica contra p27 (verd) i insulina (vermell) en talls histològics tal i com s'indica a Materials i Mètodes i se'n va triar una imatge representativa. Ampliació 400x.

A

Cdk-4/Insulina



B

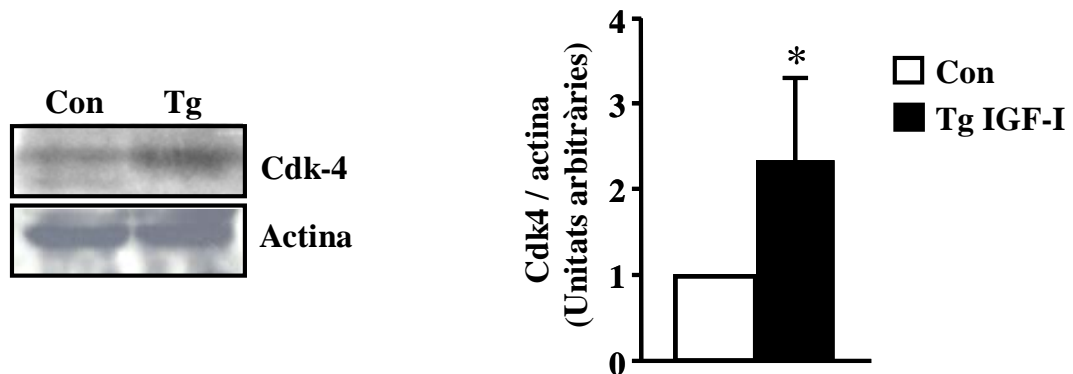


Figura 9. Estudi dels nivells d'expressió i la localització intracel·lular de Cdk-4. A) Anàlisi immunohistoquímic de l'activador Cdk-4. Talls histològics de pàncrees controls i transgènics d'animals sans i dos mesos després del tractament amb STZ van ser incubats amb un anticòs contra Cdk-4 (verd) i un altre contra insulina (vermell), tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Ampliació 400x. B) Anàlisi de l'expressió de Cdk-4. Es va determinar la quantitat de Cdk-4 mitjançant Western-blot d'extractes de proteïna d'illots aïllats de ratolins control i transgènic IGF-I, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els nivells de proteïna total es van normalitzar amb l'expressió d'actina. Cdk-4 corresponia a una banda de 30 KDa i, l'actina, a una de 42 KDa. *Esquerra:* immunoblot representatiu. *Dreta:* densitometria de tres immunoblots diferents on el carril control i el transgènic corresponien a extractes de proteïnes de quatre animals per grup. El resultat és la mitja±SEM de tres experiments diferents. *P<0,05.

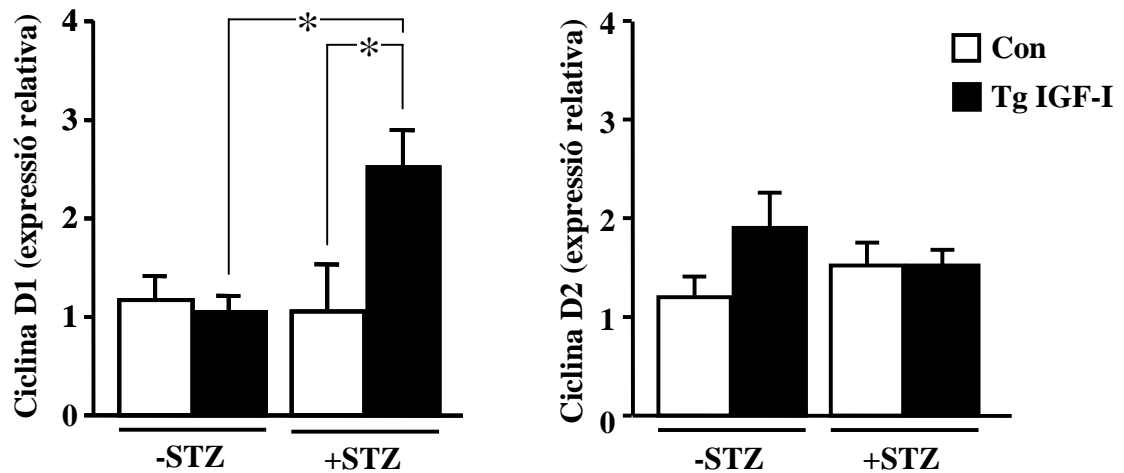
La sobreexpressió d'IGF-I incrementava l'activació de la seva cascada de senyalització, (incrementava P-Akt), però induïa la replicació de les cèl·lules β a uns nivells no prou elevats com per donar hiperplàsia en els animals sans. En canvi, després d'un dany (com la injecció de STZ), les cèl·lules β dels ratolins transgènics proliferaven a un índex molt superior que en els illots controls. Així doncs, vam estudiar com IGF-I modulava la maquinària del cicle cel·lular abans i després del tractament amb STZ.

L'activitat de la Cdk-4 requereix de la unió d'una de les seves ciclines reguladores, la ciclina D1 o la D2 (Malumbres, 2005). Per tant, caldria un increment, no només de Cdk-4, sinó també d'una de les ciclines, perquè hi hagués una major activitat del complex Cdk-4/ciclina. Així, es va estudiar l'expressió d'aquestes ciclines mitjançant PCR quantitativa en extractes de RNA d'illots d'animals controls i transgènics.

No s'observà un increment en els nivells de RNA de cap de les dues ciclines en els illots transgènics respecte els controls. Per tant, l'increment en els nivells de Cdk-4 en els illots transgènics no anava acompanyat d'un augment en els nivells de les ciclines. Aquest resultat explicaria, en part, que els animals transgènics sans no desenvolupessin hiperplàsia (Figura 10A). Es va mesurar també l'expressió de les ciclines D1 i D2 deu dies després del tractament amb STZ. En aquest cas, es va trobar que els illots transgènics presentaven un increment de gairebé 3 vegades en l'expressió de la ciclina D1, mentre que l'expressió de la ciclina D2 no es modificava (Figura 10A).

Mitjançant una doble anàlisi immunohistoquímica per ciclina D1 i insulina, vam observar en els nuclis de les cèl·lules β , uns nivells d'aquesta proteïna similars en els illots controls i transgènics dels animals sans. Dos mesos després del tractament amb STZ, en els illots controls es va observar una disminució en el marcatge de ciclina D1 nuclear respecte els animals sans. Per contra, els illots dels animals transgènics tractats mostraven un increment en la ciclina D1 nuclear (Figura 6B). D'aquesta manera, després del dany induït per la STZ, l'expressió i la localització nuclear de la ciclina D1 incrementaven en les cèl·lules β dels animals transgènics. Així, la major taxa de proliferació de cèl·lules β en els animals transgènics mesurada després del tractament amb STZ concordaria amb un increment de Cdk-4 i ciclina D1.

A



B

Ciclina D1 / Insulina

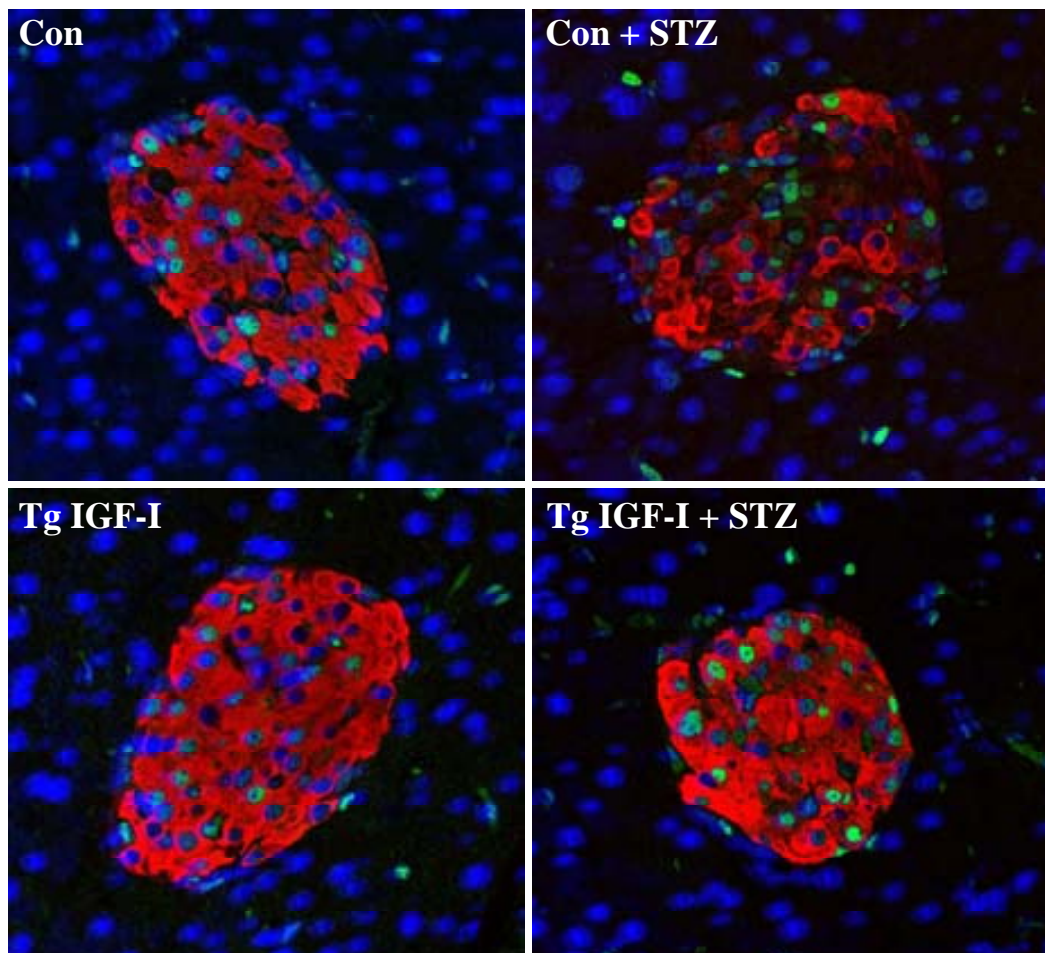


Figura 10. A) Determinació de l'expressió de les ciclines D1 i D2. Es va mesurar l'expressió de les ciclines D1 i D2 per Q-PCR a partir de RNA d'illots d'animals controls i transgènics sans i 10 dies després del tractament amb STZ, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. El resultat és la mitja±SEM de 3 experiments independents abans i tres experiments després de la STZ. Cada extracte es va obtenir a partir dels illots de 3 animals per grup (*P<0,05). **B) Anàlisi immunohistoquímica de la ciclina D1.** Es va realitzar una doble tinció immunohistoquímica contra ciclina D1 (verd) i contra insulina (vermell) en talls histològics de pàncrees de ratolins controls i transgènics sans i 2 mesos després del tractament amb STZ. Ampliació 400x.

El complexe Cdk-4/ciclina D ha d'estar fortament regulat per mantenir el correcte control del cicle cel·lular. Un dels seus reguladors és l'inhibidor del cicle cel·lular p21 (Malumbres, 2005; Cózar- Castellano, 2006a). Mitjançant PCR quantitativa, es va observar que l'expressió de p21 incrementava gairebé 3 vegades en els illots transgènics respecte els controls sans (Figura 11). En canvi, deu dies després del tractament amb STZ, l'expressió de p21 en els illots transgènics es normalitzava respecte els illots control. Per tant, una major expressió de p21 podria ajudar a frenar la progressió del cicle cel·lular en els illots d'animals transgènics sans. Aquesta inhibició es perdria després de la inducció de diabetis experimental, ja que els nivells de p21 s'igualaven als dels controls, suggerint que IGF-I només activaria la replicació després d'un dany a la cèl·lula β .

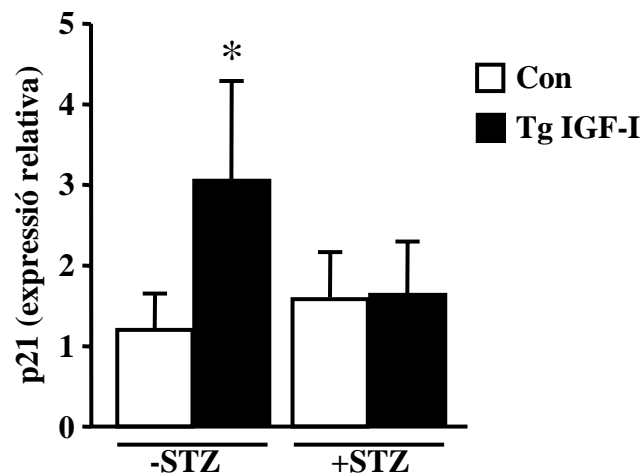


Figura 11. Determinació de l'expressió de p21. Es va mesurar l'expressió de l'inhibidor de ciclins p21 per PCR quantitativa a partir de RNA d'illots d'animals controls i transgènics sans i d'aquests animals 10 dies després del tractament amb STZ (5x40mg/kg), tal i com s'indica a Materials i Mètodes. El resultat és la mitja \pm SEM de tres experiments independents abans del tractament amb STZ i tres experiments diferents després de la STZ. Cada experiment consta d'un extracte de RNA de cada grup experimental i cada extracte es va obtenir a partir dels illots de tres animals per grup (*P<0,05).

5. CARACTERITZACIÓ DE LA VASCULARITZACIÓ DELS ILLOTS TRANSGÈNICS IGF-I I LA SEVA IMPLICACIÓ EN LA REGENERACIÓ DEL PÀNCREES ENDOCRÍ.

Les cèl·lules endotelials subministren senyals per a la supervivència i la proliferació de les cèl·lules β sobretot a través de la seva ECM (Lammert, 2001; Nikolova, 2006). A més, s'ha descrit, en diferents tipus cel·lulars, que IGF-I pot induir l'expressió del factor pro-angiogènic VEGF (Punglia, 1997; Miele, 2000). Per tot això, l'endoteli i la membrana basal dels vasos dels illots, així com els nivells de VEGF secretats pels illots podrien estar implicats en la regulació de la massa de cèl·lula β per part de l'IGF-I. Així doncs, ens vam plantejar estudiar l'expressió de VEGF i la vascularització dels illots transgènics.

Vam mesurar l'expressió de VEGF mitjançant Western-blot a partir d'extractes de proteïna d'illots d'animals controls i transgènics sans de 2 mesos d'edat. En els illots control, la proteïna VEGF era pràcticament indetectable mentre que, en els transgènics, vam trobar un increment de cinc vegades en la seva expressió (Figura 11A). Donat que els illots IGF-I produïen gran quantitat de VEGF, vam analitzar la vascularització d'aquests illots. Amb aquest objectiu, en primer lloc, vam mesurar indirectament la quantitat de cèl·lules endotelials en els illots controls i transgènics. Així, vam determinar l'expressió del marcador específic de cèl·lula endotelial PECAM-1 o CD31 (Muller, 1993; Delisser, 1994) mitjançant PCR quantitativa a partir d'extractes d'illots control i transgènics. Es van observar uns nivells d'expressió similars, fet que ens suggeria que tenien un nombre similar de cèl·lules endotelials per illot (Figura 11B).

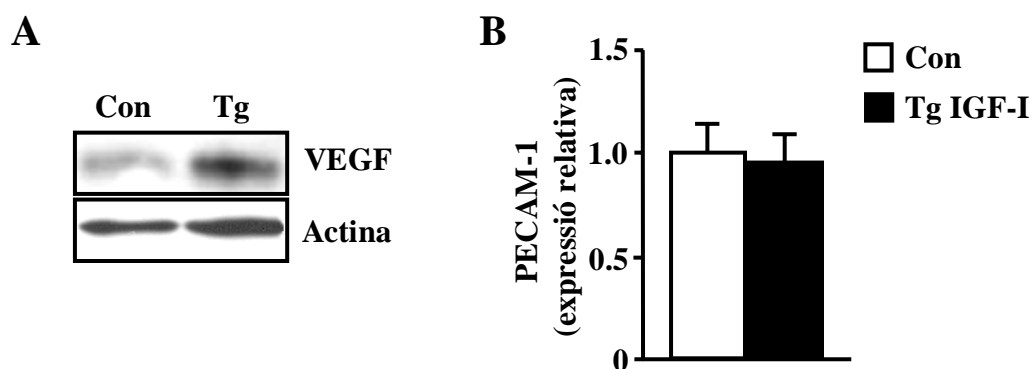


Figura 12. Anàlisi de l'expressió de VEGF i de PECAM-1 dels illots. A) Western-blot de VEGF. Mitjançant la tècnica de Western-blot a partir d'extractes proteïcs d'illots es va determinar l'expressió de VEGF, tal i com s'explica a Materials i Mètodes. Per a quantificar els nivells totals de proteïna es va utilitzar l'expressió d'actina. El VEGF correspon a una banda de 23KDa i l'actina, a una de 42KDa. L'experiment es va repetir dues vegades i cada extracte corresponia als illots de quatre animals per grup. B) Expressió de PECAM-1 o CD31 (marcador endotelial). Es va determinar indirectament si hi havia diferències en la quantitat d'endoteli per illot mitjançant els nivells l'expressió de PECAM-1 per Q-PCR, com s'indica a Materials i Mètodes. El resultat és la mitja \pm SEM de tres experiments diferents. Cada experiment constava d'un extracte control i un altre transgènic, i cada extracte provenia dels illots de tres animals.

A continuació, es van realitzar seccions de pàncrees d'animals controls i transgènics i es van incubar amb anticossos contra insulina i contra col·lagen tipus IV. El col·lagen tipus IV és un component de la matriu extracel·lular que és particularment abundant a la membrana basal de les cèl·lules endotelials, de manera que permet la detecció dels vasos (Yurchenco, 1990). Els illots transgènics no mostraven un increment en el nombre ni en el tamany (longitud i amplitud) dels vasos (Figura 13). Aquest resultat concordaria amb l'obtingut a partir de l'anàlisi de l'expressió de PECAM-1. Tampoc es va observar una major expressió de col·lagen IV en els capil·lars dels illots que pogués indicar un engruiximent de la membrana basal.

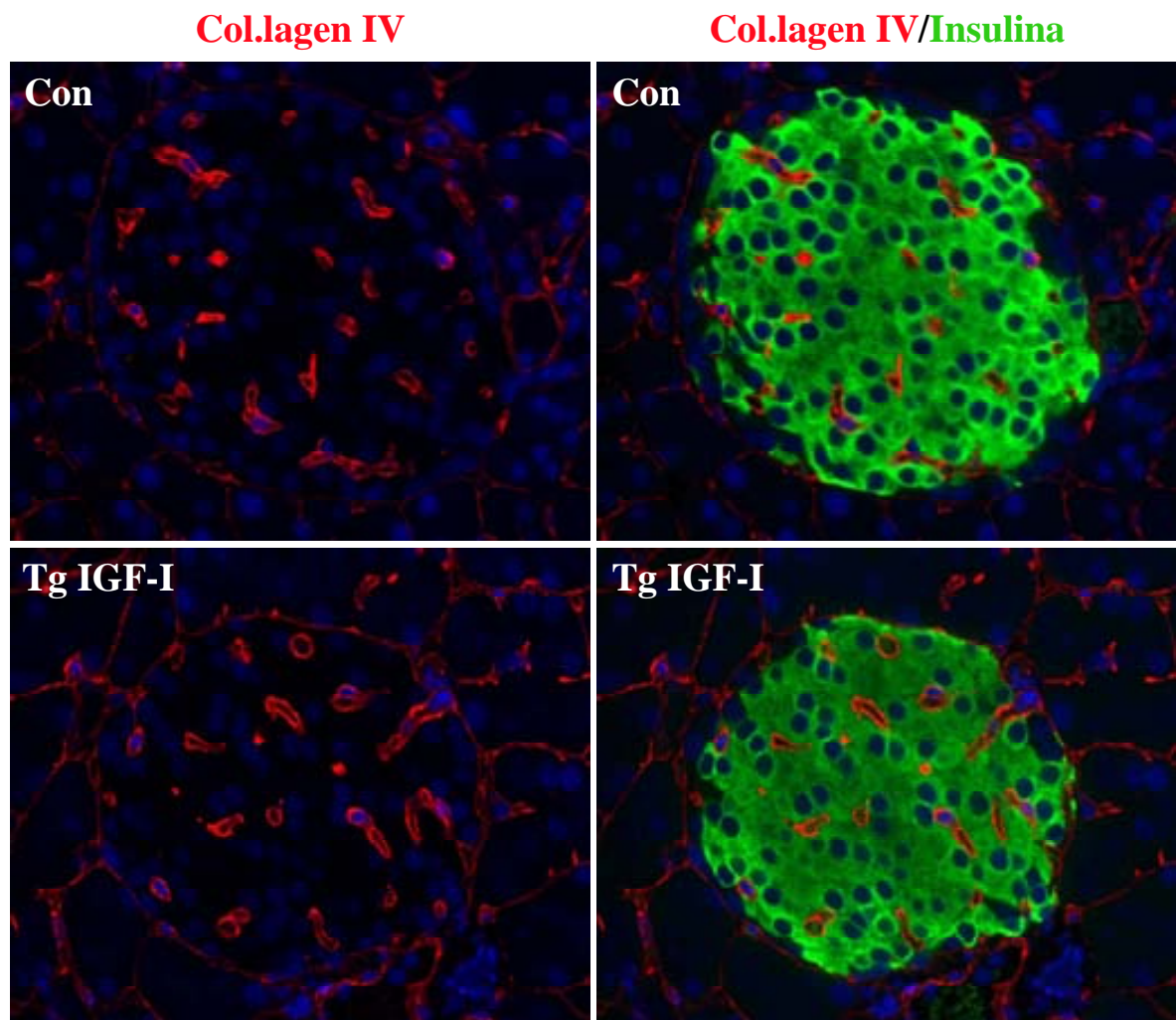


Figura 13. Detecció dels vasos mitjançant l'anàlisi immunohistoquímic contra col·lagen tipus IV. Es va realitzar una doble tinció anti-insulina (verd) i anti-col·lagen IV (vermell) en talls histològics d'animals controls i transgènics, per visualitzar la vascularització dels illots, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Ampliació 400x.

Els illots de Langerhans presenten una vascularització formada per capil·lars molt permeables i fenestrats, fet que permet l'accés directe de les cèl·lules endocrines al torrent sanguini (Olsson, 2006; Ballian, 2007). Aquesta permeabilitat és deguda a la secreció de VEGF per part del propi illot, principalment per les cèl·lules β pancreàtiques. Així, vam examinar l'efecte de l'increment de VEGF en la permeabilitat i el funcionament dels vasos dels illots en els ratolins transgènics. Es va analitzar el fluxe sanguini dels illots mitjançant la injecció intravenosa d'una solució de dextrà conjugat amb fluoresceïna (FITC-dextrà). La fluoresceïna apareixia dins dels capil·lars dels illots transgènics de forma similar a com ho feia als illots control, i hi mostrava una perfusió normal i sense extravasació (Figura 14). Per tant, l'increment en l'expressió de VEGF als illots d'animals transgènics no semblava modificar la seva irrigació, ni la quantitat de vasos, ni la permeabilitat a molècules del tamany del dextrà.

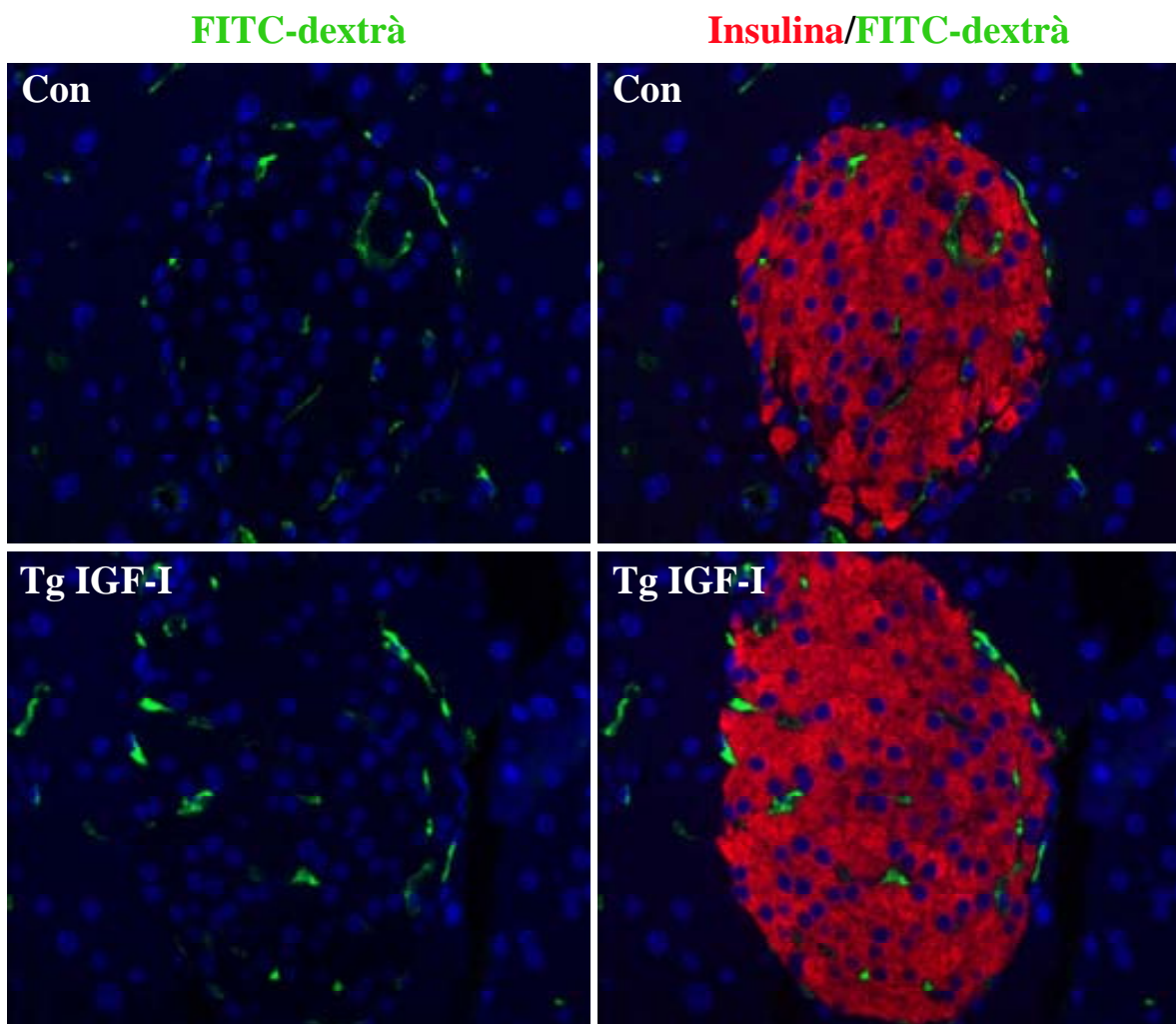


Figura 14. Detecció dels vasos i anàlisi de la seva permeabilitat mitjançant la perfusió amb FITC-dextrà. Tres animals controls i tres transgènics van ser injectats per la vena de la cua amb una solució de dextrà-fluoresceïna per tal d'estudiar la perfusió dels vasos. A partir dels pàncrees d'aquests animals es van realitzar seccions que es van incubar amb un anticòs contra insulina (vermell), tal i com s'explica a Materials i Mètodes. Ampliació 400x.

Per tal de mantenir la la permeabilitat dels vasos i assegurar l'arribada de les hormones a la sang, els illots pancreàtics secreten nivells importants del factor angiogènic VEGF. No obstant, en condicions fisiològiques, la massa de cèl·lules endotelials dels illots es manté estable, és a dir, les cèl·lules endotelials dels illots es renoven amb una taxa baixa (Olsson, 2007). Això és degut a que els illots pancreàtics produeixen, per una banda factors pro-angiogènics com el VEGF, i, per l'altra, factors anti-angiogènics com l'endostatina i el PEDF (Factor Derivat de l'Epiteli Pigmentari) (Matsson, 2007).

Així doncs, es va mesurar l'expressió del factor PEDF en extractes protèics d'illots d'animals controls i transgènics RIP/IGF-I mitjançant la tècnica de Western-blot (Figura 15). Els illots transgènics IGF-I expressaven nivells més alts d'aquest factor anti-angiogènic que els controls. Per tant, la sobreexpressió d'IGF-I induïa un increment en l'expressió d'un factor activador (VEGF) i al mateix temps d'un factor inhibidor de l'angiogènesi (PEDF), fet que concordaria amb un manteniment de la vascularització dins d'uns paràmetres de normalitat.

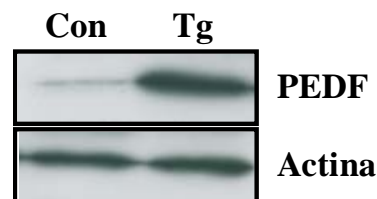


Figura 15. Anàlisi de l'expressió del factor anti-angiogènic PEDF. Mitjançant la tècnica de Western-blot a partir d'extractes protèics d'illots d'animals controls i transgènics es va determinar l'expressió de PEDF, tal i com s'explica a Materials i Mètodes. Per a quantificar els nivells totals de proteïna es va utilitzar l'expressió d'actina. El PEDF correspon a una banda de 50 KDa i l'actina, a una de 42 KDa. L'experiment es va repetir dues vegades i cada extracte corresponia als illots de quatre animals per grup.

La sobreexpressió d'IGF-I incrementava l'expressió de factors pro i anti-angiogènics, de manera que la massa de cèl·lules endotelials es mantenia constant en els illots dels animals transgènics IGF-I.

Per tal d'examinar el paper de VEGF i de l'endoteli, sense un increment en altres factors, es va continuar aquest treball amb l'estudi de l'efecte de la sobreexpressió de VEGF en cèl·lules β d'animals transgènics.

***PART II: ESTUDI DEL PAPER DEL VEGF I
DE L'ENDOTELI VASCULAR EN LA FUNCIO
I LA VIABILITAT DEL PANCREES
ENDOCRÍ.***

La vascularització dels illots pancreàtics regula la secreció d'insulina i l'accés dels secretagogs i els nutrients a les cèl.lules endocrines. Així, el creixement dels illots, que té lloc durant períodes amb una major demanda d'insulina (Bonner-Weir, 2001), requereix d'un procés d'angiogènesi que permeti la irrigació les noves cèl.lules endocrines (Ballian, 2007). A més, alteracions en la permeabilitat i el fluxe de la microcirculació dels illots han estat relacionades amb el desenvolupament de diabetis (Olsson, 2006; Ballian, 2007), en diferents models de diabetis tant tipus 1, com els ratolins NOD (Papaccio, 2002) o tipus 2, com les rates GK (Carlsson, 2002).

Per altra banda, els vasos dels illots no només permeten el creixement i la supervivència de les cèl.lules β per l'arribada de factors i nutrients a través del fluxe sanguini, sinó que, les cèl.lules endotelials directament emeten senyals que promouen la proliferació i l'expressió del gen de la insulina (Nikolova, 2006; Nikolova, 2007). Fins i tot, s'ha descrit que l'endoteli del pàncrees indueix la diferenciació de les cèl.lules β durant el desenvolupament (Lammert, 2001).

El principal regulador de la formació i del manteniment dels capil.lars dels illots durant períodes pre-natals, així com a l'adult, és el VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Lammert, 2003b; Brissova, 2006). A més, també juga un paper clau en la formació de les fenestracions i la regulació de la permeabilitat, imprescindibles per la funció dels illots (Kuroda, 1995; Lammert, 2003b).

Per tots aquests motius, a la **part II** d'aquest treball vam estudiar la funció del factor angiogènic VEGF en el manteniment i la viabilitat de la massa de cèl.lula β , i en la regulació de la secreció d'insulina i l'homeòstasi de la glucosa.

1. OBTENCIÓ DE RATOLINS TRANSGÈNICS QUE SOBREEXPRESSEN VEGF A LES CÈL·LULES β .

Així, amb l'objectiu d'estudiar el paper del factor pro-angiogènic VEGF i de l'endoteli vascular en la funció i la viabilitat del pàncrees endocrí, es van obtenir ratolins transgènics que sobreexpressaven VEGF específicament en les cèl·lules β pancreàtiques (RIP-I/VEGF).

1.1. Construcció del gen quimèric RIP-I/VEGF₁₆₄.

Per tal d'aconseguir la sobreexpressió de VEGF específicament a les cèl·lules β dels illots de Langerhans, vam utilitzar el promotor del gen de la insulina 1 de rata (RIP-I). Aquest promotor permet l'expressió d'un gen exogen a les cèl·lules β del pàncrees, tant en animals transgènics com en cèl·lules en cultiu (Walker et al., 1983; Hanahan, 1985; Selden et al., 1986; Bucchini et al., 1986; Fromont-Racine et al., 1990). Per a la construcció del transgèn, es va partir del vector *pBlueScriptKS/RIP-I/ β -globina* on hi havia el promotor *RIP-I* i, un intró del gen de la β -globina i la senyal de poliadenilació de l'*antigen T SV40* que permeten assegurar l'estabilitat del mRNA.

El VEGF o VEGF-A és un gen únic, que per *splicing* alternatiu dóna diferents isoformes. D'aquestes, es va seleccionar la isoforma VEGF₁₆₄, perquè és la que té una major activitat biològica i té capacitats intermitges pel que fa a difusibilitat respecte la unió a matriu extracel·lular (Houck, 1992; Byrne, 2005). El cDNA VEGF₁₆₄, amb la seqüència codificant sencera i la senyal de *poliA*, es trobava en el plàsmid *pBlueScriptIIKS⁺/VEGF₁₆₄*. (subministrat per la Dra. P. D'Amore). Mitjançant la digestió d'aquest plàsmid *pBS/VEGF₁₆₄* amb els enzims *BamHI* i *HinDIII* vam obtenir el cDNA (623pb). El cDNA es va clonar dins la diana *EcoRI* del vector *pBSIIKS/RIP-I/ β -globina*, després del promotor *RIP-I/ β -globina*. Per fer-ho, abans es va subclonar el cDNA en el plàsmid *pGEM-4Z* i va ser digerit amb *EcoRI*, obtenint-se el cDNA amb dianes *EcoRI* ambdós extrems 5' i 3' (Figura 16).

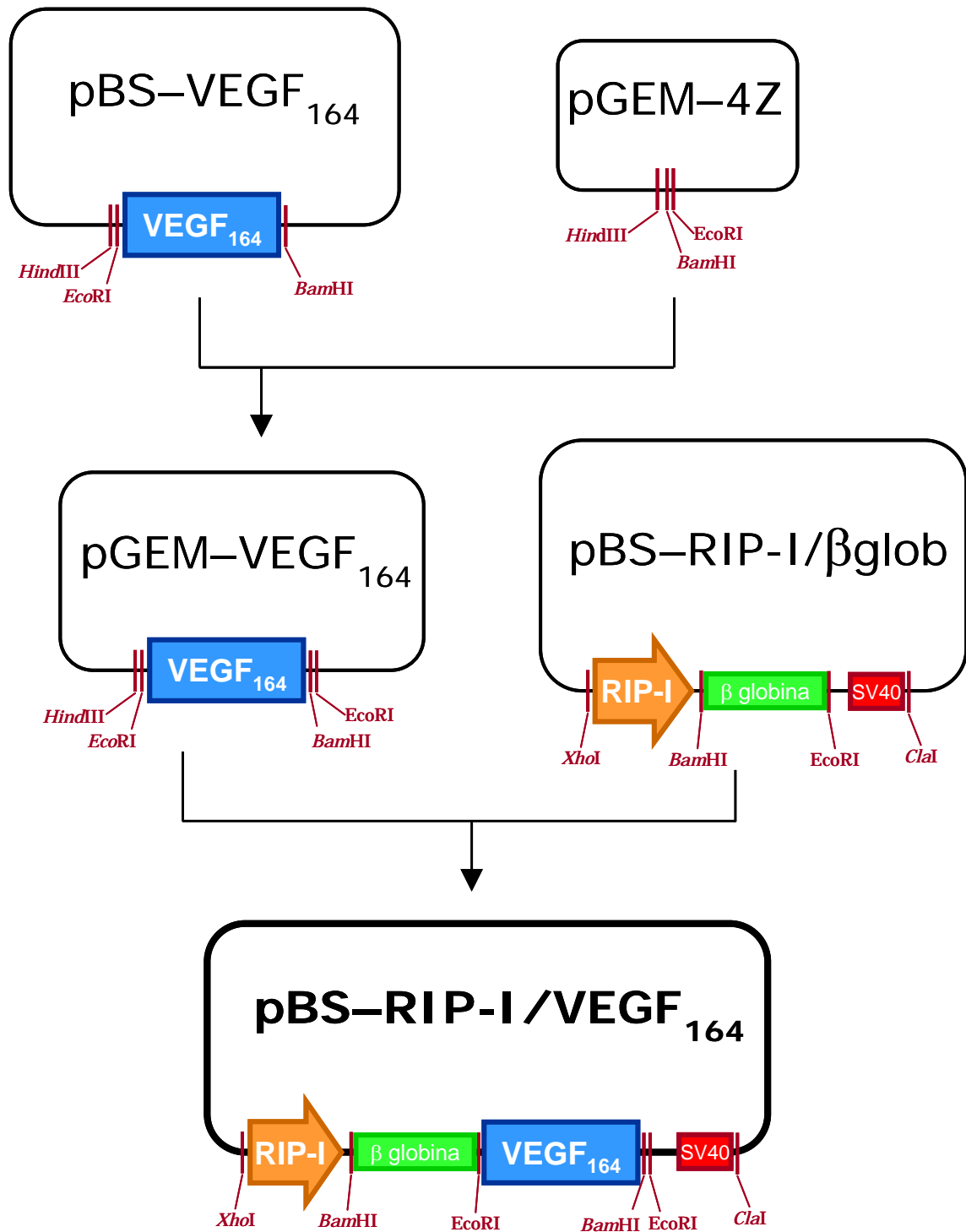


Figura 16. Construcció del transgèn RIP-I/VEGF. Es va subclonar el fragment *HinDIII-BamHI* del cDNA de VEGF en el plàsmid *pGEM*. A continuació, es va subclonar el fragment *EcoRI-EcoRI* del cDNA al vector *pRIP-I/βglobina*.

1.2. Generació de ratolins transgènics mitjançant la microinjecció d'òcits fecundats.

El gen quimèric RIP-I/VEGF es va aïllar del vector mitjançant una digestió amb els enzims de restricció *XhoI* i *ClaI*, es va purificar per electroelusió i es va microinjectar en òcits fecundats de ratolí de la soca híbrida C57Bl6/SJL. Van néixer un total de 54 cries i, es va analitzar per *Southern-blot* quines d'elles havien integrat el transgèn. Es va obtenir DNA genòmic d'un fragment de cua de cada ratolí i se'n van digerir 10 µg amb l'enzim de restricció *BamHI*. El transgèn RIP-I/VEGF conté dues dianes *BamHI*, una a l'intró de la β -globina i l'altra a l'extrem 3' del cDNA VEGF₁₆₄, de manera que la digestió amb *BamHI* donava una banda de 1.2Kb. La detecció es va realitzar mitjançant la hibridació amb una sonda que era el cDNA VEGF₁₆₄ marcat amb ³²P. D'aquesta manera es van trobar quatre animals transgènics que van ser numerats del 1 al 4 i van ser utilitzats com a fundadors per l'establiment de diferents línies. El percentatge de descendents F₁ transgènics de cada fundador va ser: del 12% a la Línia 1 (Tg VEGF 1), del 6% a la Línia 2 (Tg VEGF 2), 2% a la Línia 3 (Tg VEGF 3) i, 0 % a la Línia 4 (Tg VEGF 4). Així doncs, el fundador número 4 mai va transmetre el transgèn a la seva descendència i, per això, va ser descartat.

La integració del transgèn al genoma és a l'atzar i normalment no ho fa com una sola còpia, sinó com una cadena de múltiples còpies unides cap-cua. Mitjançant la tècnica del *Southern blot* es va determinar el número de còpies del transgèn que hi havia a cada línia. Així, a partir de DNA obtingut de la descendència, es va obtenir que la línia 3 presentava unes 5 còpies, la 2, unes 8 còpies i la 1, unes 10 còpies (Figura 17).

Durant tot el treball, les diferents línies d'animals RIP-I/VEGF es van mantenir per separat, creuant ratolins transgènics amb ratolins controls de fons genètic híbrid C57Bl6/SJL. Tots els estudis es van realitzar comparant els animals transgènics mascles de cada línia amb els seus germans controls de la mateixa edat, per tal de minimitzar la variabilitat a les diferents determinacions.

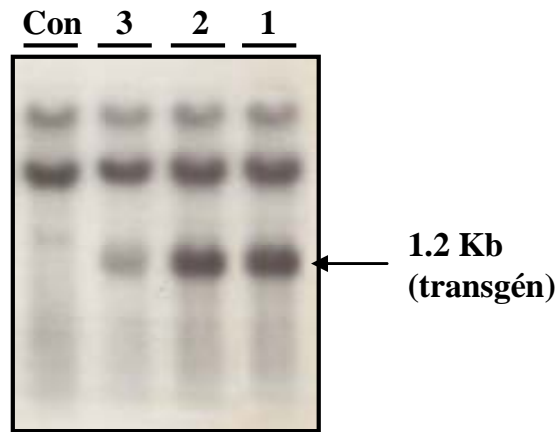


Figura 17. Southern-blot dels animals RIP-I/VEGF. La banda de 1.2 Kb correspon al gen quimèric, la resta de bandes són del gen endogen. Es van quantificar el nombre de còpies: la línia 3 tenia aproximadament unes 5 còpies i la línia 1 i la línia 2 tenien unes 8-10 còpies.

1.3. Anàlisi de l'expressió del gen quimèric RIP-I/VEGF.

Una vegada establertes les diferents línies de la colònia d'animals, calia determinar si el transgèn s'expressava i, si ho feia específicament als illots de Langerhans del pàncrees. Per la detecció de l'expressió del gen quimèric, primerament es va realitzar una anàlisi per *Northern blot* a partir de RNA extret de pàncrees total. El *Northern blot* es va hibridar amb una sonda específica obtinguda a partir del cDNA VEGF₁₆₄. Així, es va detectar una banda corresponent al mRNA del transgèn a Tg VEGF 1 i 2. No obstant, no es va detectar l'expressió del gen quimèric en els pàncrees dels ratolins Tg VEGF 3 (Figura 18). Això podia ser degut a la falta de sensibilitat de la tècnica, ja que es va utilitzar RNA de pàncrees total enlloc de RNA d'illots. Cal considerar que l'expressió del transgèn s'ha de donar només a les cèl·lules β i que aquestes representen menys d'un 1% de la massa del pàncrees, o bé, que el gen quimèric no s'expressés. En aquest primer anàlisi semblava que els animals Tg VEGF 1 presentaven una major expressió del transgèn que els Tg VEGF 2.

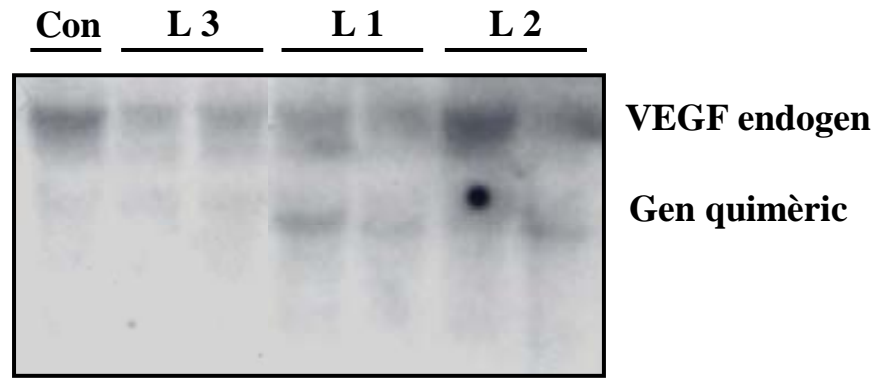


Figura 18. Anàlisi de l'expressió del RNA del transgèn RIP-VEGF. Mitjançant la tècnica de Northern-blot a partir d'extractes de RNA obtingut de pàncrees sencer d'animals controls i transgènics de les tres línies es va analitzar l'expressió del transgèn així com la del gen VEGF endogen, tal i com s'indica a Materials i Mètodes.

La sobreexpressió específica de VEGF als illots pancreàtics, es va analitzar per *Western blot* d'extractes protèics d'illots. En els illots dels Tg VEGF 2, la banda era unes tres vegades més intensa que en els controls i, als Tg VEGF 1, d'un quatre vegades. Per contra, als illots Tg VEGF 3 no semblava haver-hi sobreexpressió de VEGF, la qual cosa indicava que en aquesta línia el transgèn no s'expressava (Figura 19), tal i com suggerien també els resultats obtinguts per *Northern blot*.

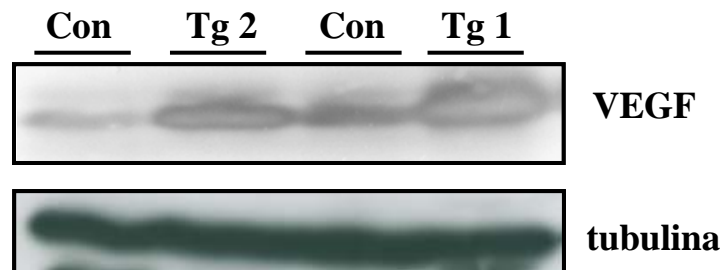


Figura 19. Detecció de la sobreexpressió de la proteïna VEGF₁₆₄. Es va determinar l'expressió de la proteïna VEGF mitjançant l'anàlisi per *Western blot* a partir d'extractes protèics d'illots d'animals controls i Tg VEGF 1 i 2. Cada extracte es va obtenir dels illots de quatre animals. Es va determinar la quantitat de proteïna amb l'expressió de tubulina. S'observà una banda de 23 KDa corresponent al monòmer de VEGF i una altra de 50 KDa corresponent a la tubulina, tal i com s'explica a Materials i Mètodes.

També es van mesurar, a les diferents línies, els nivells sèrics de VEGF i no es va trobar un augment de la concentració de VEGF en sang. Els ratolins controls presentaven una concentració de 226 ± 47 pg/ml, mentre que en els ratolins transgènics els nivells eren de 185 ± 39 pg/ml a la línia 1, 233 ± 42 pg/ml a la línia 2 i de 260 ± 34 pg/ml a la línia 3. Així doncs, no es va observar un augment en els nivells de VEGF circulants i, per tant, els canvis fenotípics que es podien observar en els ratolins transgènics haurien de ser conseqüència de les alteracions al pàncrees per l'increment local d'aquest factor, a través d'un efecte paracrí.

2. ESTUDI DE LA MORFOLOGIA I LA FUNCIONALITAT DE LA VASCULARITZACIÓ DELS ILLOTS EN ELS RATOLINS RIP-I/VEGF.

2.1. Determinació del nivell de vascularització.

En primer lloc vam estudiar si la sobreexpressió de VEGF induïa algun canvi a nivell morfològic de la vascularització en el pàncrees endocrí.

2.1.1. Determinació del nivell de vascularització mitjançant el marcatge de la membrana basal de l'endoteli dels vasos.

Com ja s'ha descrit anteriorment, el factor de creixement VEGF és un potent activador de l'angiogènesi, de manera que la seva sobreexpressió podia induir un augment en la vascularització del pàncrees o, específicament, dels illots. Igual que a l'estudi dels ratolins RIP-I/IGF-I, per a la detecció dels vasos, vam realitzar una tinció immunohistoquímica contra el col·lagen tipus IV, propi de la làmina basal (Yunchenco, 1990). Es van estudiar els pàncrees de 4 mascles controls i 4 transgènics de dos mesos d'edat de cada línia. Vam observar que ni els illots ni el pàncrees exocrí dels ratolins transgènics de la línia 3 no presentaven un increment en la vascularització (Figura 20). Això, juntament al fet de no detectar la sobreexpressió de VEGF en el *Western blot*, ens indicava que el transgèn no s'expressava en aquesta línia o, si ho feia, era a nivells molt baixos. Per aquest motiu, es va descartar aquesta línia per a la resta d'estudis.

En canvi, els illots d'animals transgènics de 2 mesos d'edat, tant de la línia 1 com de la 2, mostraven un marcat increment en el nombre de vasos. Gràcies al marcatge amb col·lagen IV vam poder observar una important xarxa de capil·lars irregulars en els illots dels animals transgènics d'ambdues línies (Figura 20A). Per tant, en aquest treball es van caracteritzar els animals Tg VEGF 1 i Tg VEGF 2.

Per contra, en el pàncrees exocrí de cap de les línies, no s'observava un increment en la vascularització.

Col.lagen IV/Insulina

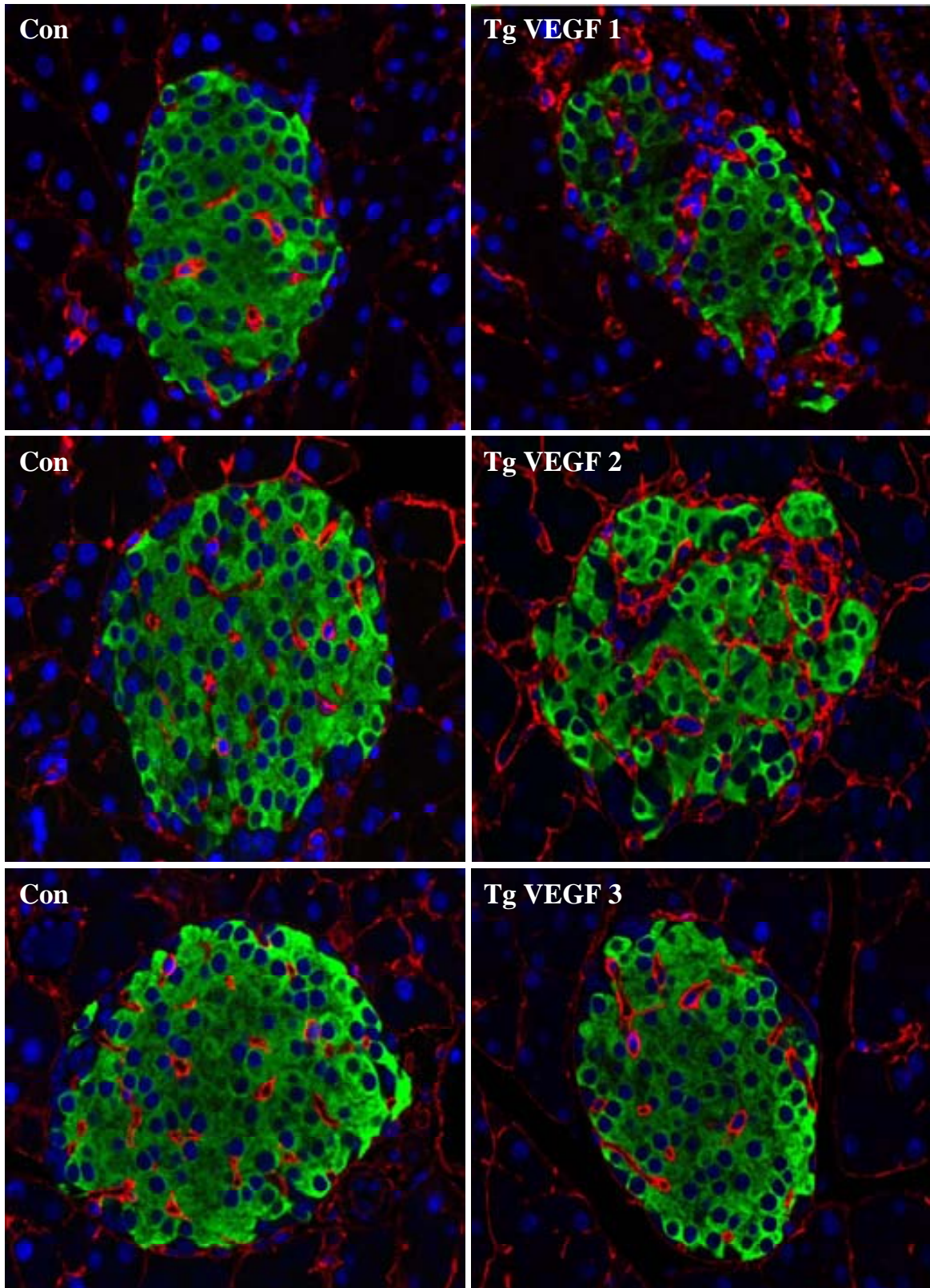


Figura 20. Estudi de la vascularització dels illots en animals controls i transgènics mitjançant el marcatge dels vasos amb col·lagen IV. Es va realitzar un marcatge immunohistoquímic anti-col·lagen tipus IV (vermell) i insulina (verd) en seccions de pàncrees d'animals controls i transgènics de totes les línies, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Magnificació x400.

2.1.2. Determinació del nivell de vascularització mitjançant l'expressió de PECAM-1.

Es va mesurar també l'expressió del marcador de cèl·lules endotelials PECAM-1 o CD31 mitjançant l'anàlisi del RNA d'illots per PCR quantitativa (Q-PCR) (Muller, 1993). Així, l'expressió PECAM-1 es va utilitzar com a indicador de diferències entre controls i transgènics en la quantitat de cèl·lules endotelials als illots. Encara que durant el procés d'aïllament dels illots es perden gran part de les cèl·lules endotelials, es va observar un increment en l'expressió d'aquest gen indicant un increment en la quantitat d'endoteli dins dels illots Tg VEGF1 i 2. Aquest augment semblava proporcional al nivell d'expressió del transgèn. Així, els illots dels animals Tg VEGF 1 van mostrar unes 8 vegades més PECAM-1 que els dels seus germans control i, els illots Tg VEGF 2 presentaven un augment de més de 5 vegades (Figura 21).

El factor de creixement VEGF és un important mitogen i quimioattractant per les cèl·lules endotelials i, així, pot augmentar el nombre de cèl·lules endotelials en un teixit i, per tant, incrementar també l'expressió de PECAM-1 (Muller, 1993; Delisser, 1994). No obstant, VEGF pot induir un increment en l'expressió de PECAM-1 a cada cèl·lula endotelial, de manera que, en els illots transgènics, podia incrementar-se la quantitat del mRNA de PECAM-1 per cèl·lula endotelial sense incrementar el nombre de cèl·lules. Per tant, encara que utilitzem PECAM-1 com a indicador indirecte de canvis en el nivell de vascularització, no podem establir una relació directa entre l'expressió d'aquest gen i el nombre de cèl·lules endotelials.

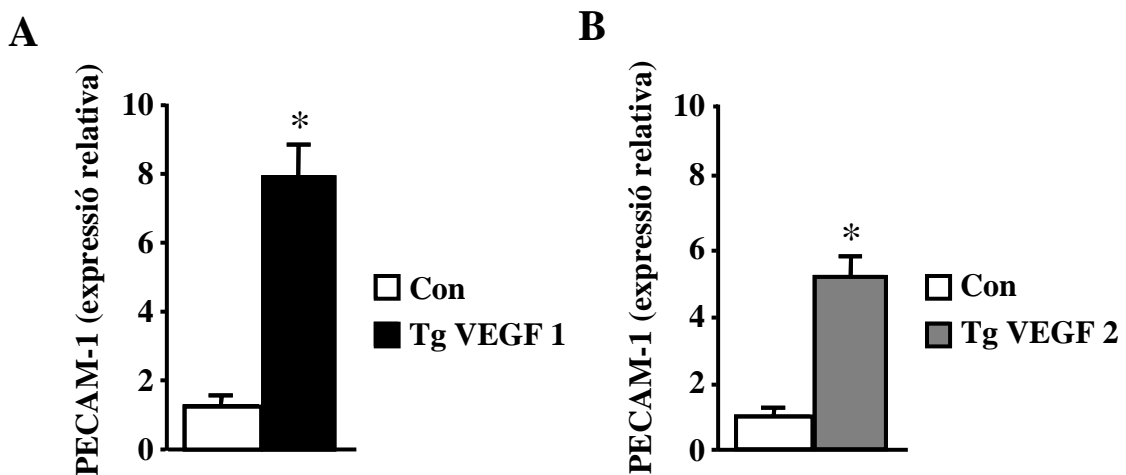


Figura 21. Anàlisi de l'expressió del marcador específic de cèl·lules endotelials PECAM-1 als illots. Mitjançant PCR quantitativa a partir de RNA d'illots controls i transgènics es va detectar un increment en l'expressió de RNA de la proteïna de membrana CD31 o PECAM-1 en els illots transgènics d'ambdues línies, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. La quantitat de RNA es va normalitzar amb l'expressió del gen RBS. El resultat és la mitja±SEM de tres experiments independents amb un extracte control i un altre transgènic obtinguts cadascun a partir dels illots de tres animals per grup. *P<0,05.

2.2. Estudi de la circulació i la permeabilitat vascular en els illots.

El principal encarregat del control de la permeabilitat i de la formació de les fenestracions en els vasos dels illots és el VEGF secretat per les cèl·lules β (Kuroda, 1995; Olsson, 2006). Per tant, la sobreexpressió de VEGF en els illots transgènics podria incrementar el nombre de fenestracions i la permeabilitat dels vasos. A més, la sobreexpressió de VEGF semblava induir un increment en la quantitat de cèl·lules endotelials en els illots transgènics. No obstant, aquestes cèl·lules endotelials podrien no formar vasos funcionals, ja que la correcta formació de vasos requereix un gradient de concentració de VEGF i altres estímuls angiogènics (Carmeliet, 2005; Coultas, 2005).

Així doncs, es va analitzar la circulació sanguínia i la permeabilitat vascular en els illots dels ratolins d'ambdues línies mitjançant la injecció intravenosa d'una solució de dextrà conjugat amb fluoresceïna (dextrà-FITC). Es van realitzar talls histològics d'aquests pàncrees i es van incubar amb un anticòs contra insulina o bé, contra col·lagen IV, per tal de marcar les cèl·lules β o bé, l'endoteli vascular. En els illots controls, el dextrà-FITC apareixia dins la llum dels capil·lars, mostrant una perfusió normal i sense extravasació. Uns pocs dels vasos dels illots Tg VEGF 1 i 2 tampoc mostraven extravassació de dextrà-FITC (Figura 22 i 23). Per tant, els illots transgènics presentaven una part dels capil·lars amb una perfusió i una permeabilitat similar a la dels vasos dels illots controls.

No obstant, només alguns dels vasos dels illots Tg VEGF 1 i 2 presentaven una morfologia normal. En aquests illots, s'hi observaven unes acumulacions de cèl·lules no β , que estaven envoltades del marcatge del dextrà-FITC. La tinció immunohistoquímica contra col·lagen IV suggeria que aquestes cèl·lules eren cèl·lules endotelials que s'agrupaven sense formar tubs i, per això, la senyal del dextrà-FITC no seguia un conducte (Figura 22). Així doncs, l'increment de VEGF als illots transgènics modificava la irrigació en algunes zones dels illots, donant lloc a vasos anòmals.

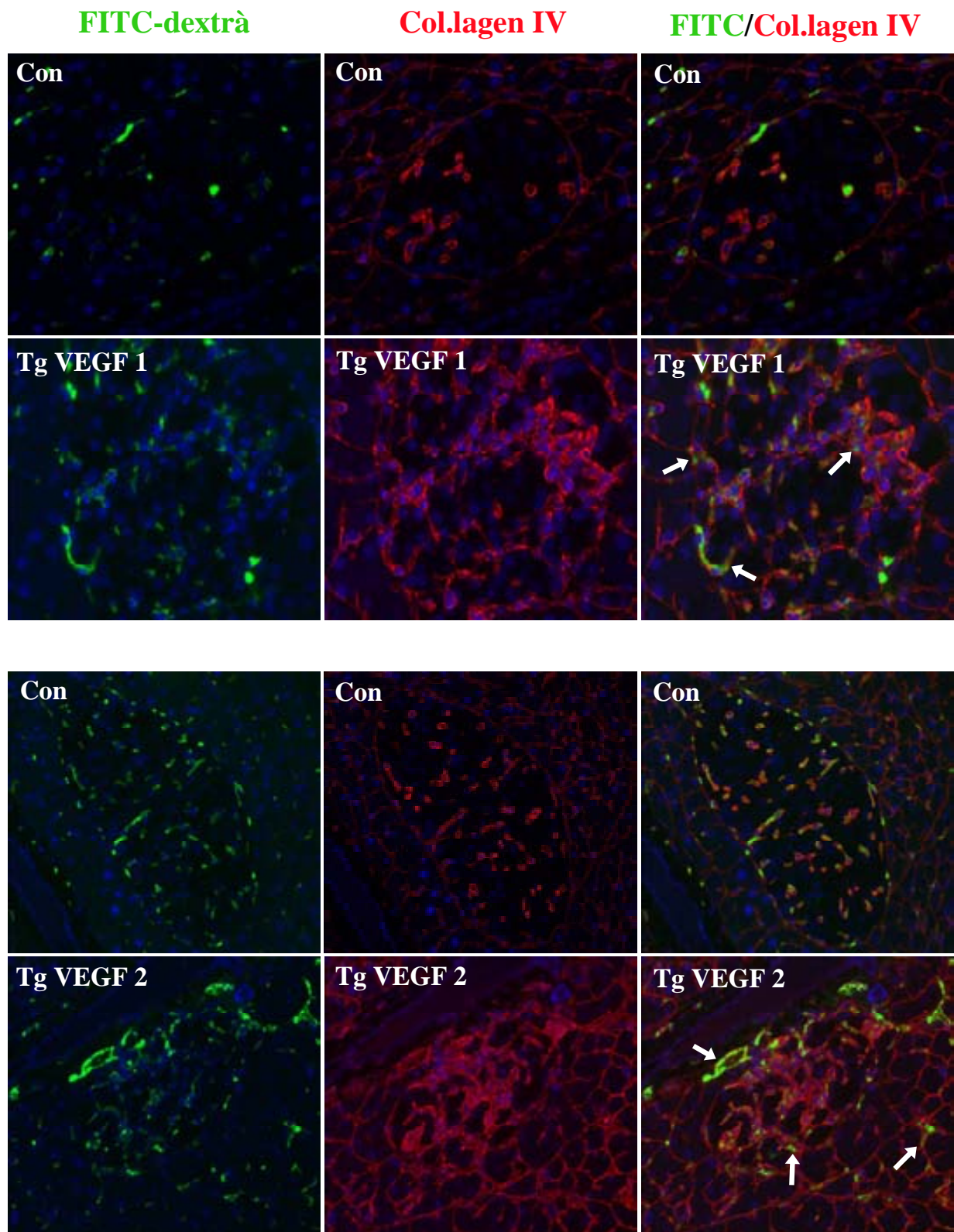


Figura 22. Estudi de la funcionalitat de la vascularització dels illots: Perfusió intravascular dels animals amb FITC-dextrà i tinció immunohistoquímica contra col·lagen IV Es va injectar una solució de dextrà conjugada amb fluoresceïna (dextrà-FITC) per la vena de la cua de dos animals controls i dos transgènics de cada línia a l'edat de dos mesos. Els pàncrees es van fixar i incloure amb parafina. Se'n van fer dues seccions per pàncrees i es van incubar amb un anticòs contra col·lagen IV, tal i com s'explica a l'apartat Materials i Mètodes. Magnificació x200.

FITC-dextrà/Insulina

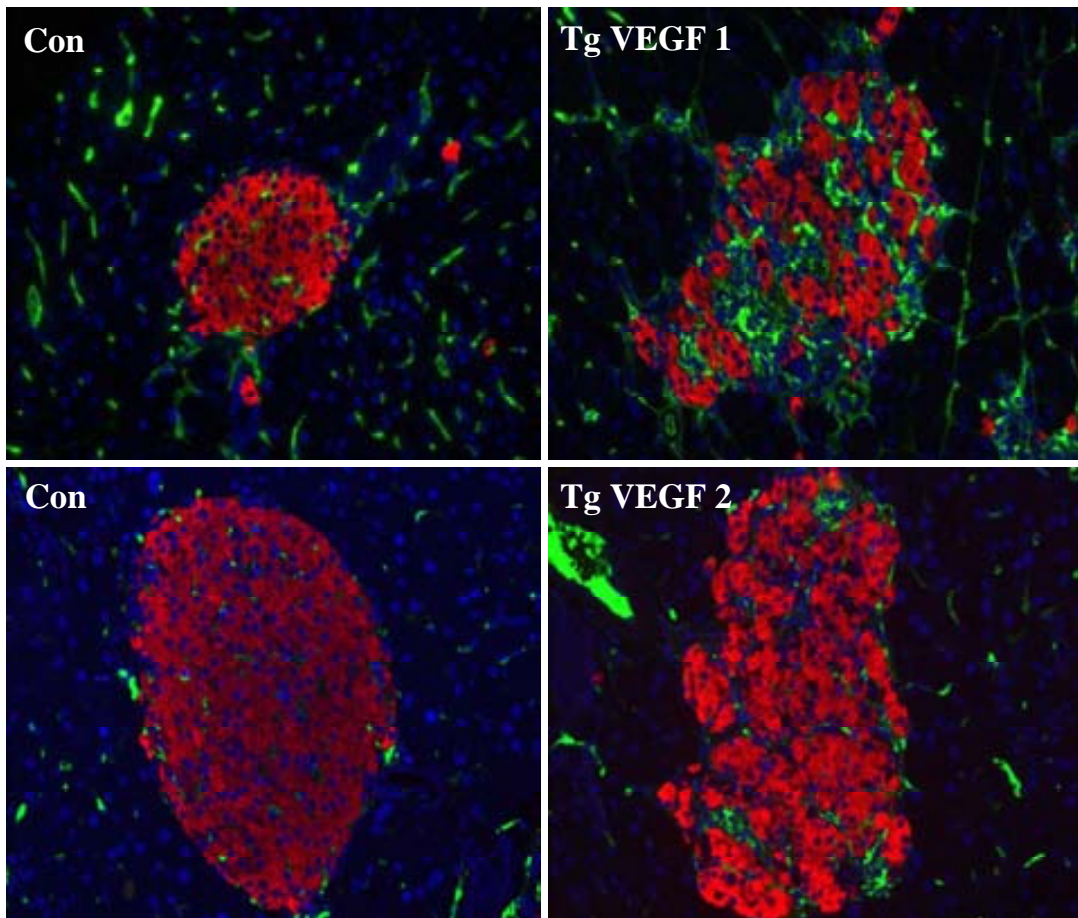


Figura 23. Estudi de la funcionalitat de la vascularització dels illots: Perfusió intravascular dels animals amb dextrà conjugat amb fluoresceïna i tinció immunohistoquímica contra insulina. Es va injectar una solució de dextrà conjugada amb fluoresceïna per la vena de la cua de dos animals controls i dos transgènics de cada línia a l'edat de dos mesos. Els pàncrees es van fixar i incloure amb parafina. Es van fer dues seccions per pàncrees i es van incubar amb un anticòs contra insulina, tal i com s'explica a l'apartat Materials i Mètodes. Magnificació x200.

3. ESTUDI MORFOLÒGIC DELS ILLOTS DE LANGERHANS.

3.1. Estudi de la distribució de les cèl·lules endocrines de l'illot.

En els illots de ratolí, els diferents tipus de cèl·lules endocrines estan distribuïdes amb les cèl·lules β al centre i, la resta, a la perifèria. Aquesta arquitectura respon a una regulació intra-illot i a un flux sanguini determinat (Brunicardi, 1996). Els illots dels ratolins transgènics presentaven zones amb irrigació anòmala i, això podia alterar l'estructura d'aquests illots. Així doncs, es va analitzar la distribució de les cèl·lules α i β mitjançant una doble tinció immunohistoquímica contra insulina i contra glucagó. D'aquesta manera es va observar que, en els pàncrees dels animals transgènics d'ambdues línies, l'organització cel·lular estava alterada, amb la presència de nombroses cèl·lules α al centre dels illots (Figura 24).

Insulina/Glucagó

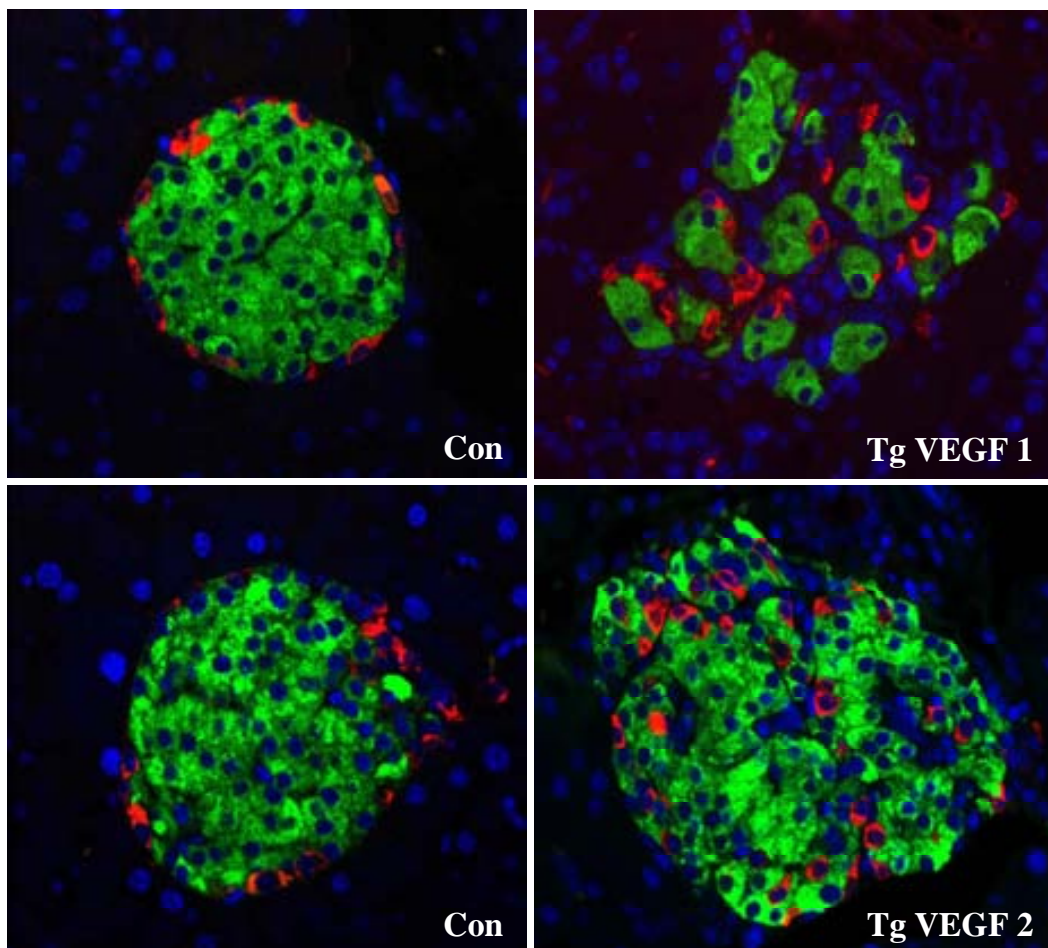


Figura 24. Estudi de la distribució de les cèl·lules endocrines dels illots dels animals transgènics de les línies 1 i 2. Es va realitzar un marcatge immunohistoquímic anti-insulina (verd) i anti-glucagó (vermell) en talls histològics de pàncrees de ratolins controls i transgènics d'ambdues línies, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Magnificació x400.

3.2. Estudi de la càpsula de cèl·lules de Schwann dels illots transgènics.

Els illots de Langerhans estan envoltats d'una càpsula formada per cèl·lules de Schwann i, la desorganització dels illots porta a la ruptura d'aquesta càpsula (Burriss, 2007). A més, s'ha descrit les cèl·lules de Schwann també expressen els receptors de VEGF. L'efecte de VEGF sobre les cèl·lules de Schwann és de quimiotaxis i, alhora, incrementa la seva supervivència i la seva proliferació *in vitro* (Sondel, 1999; Storkebaum E, 2004).

Així doncs, vam analitzar les cèl·lules de Schwann en els illots dels ratolins transgènics mitjançant una doble tinció immunohistoquímica contra insulina i contra un marcador de cèl·lules de Schwann, la proteïna GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) (Sunami, 2001). Els illots controls mostraven una fina envolta positiva per GFAP. En canvi, els illots dels ratolins Tg VEGF 1 i 2, en cap cas mostraven una càpsula completa. En algunes zones, només s'observava una lleugera senyal adjacent a les cèl·lules i no necessàriament a la perifèria de l'illot, en altres, en canvi, s'observava un increment important de la senyal, suggerint una major acumulació de cèl·lules de Schwann. Així, la càpsula glial dels illots dels ratolins transgènics als dos mesos estava desestructurada, amb interrupcions i engruiximents en diferents zones (Figura 25).

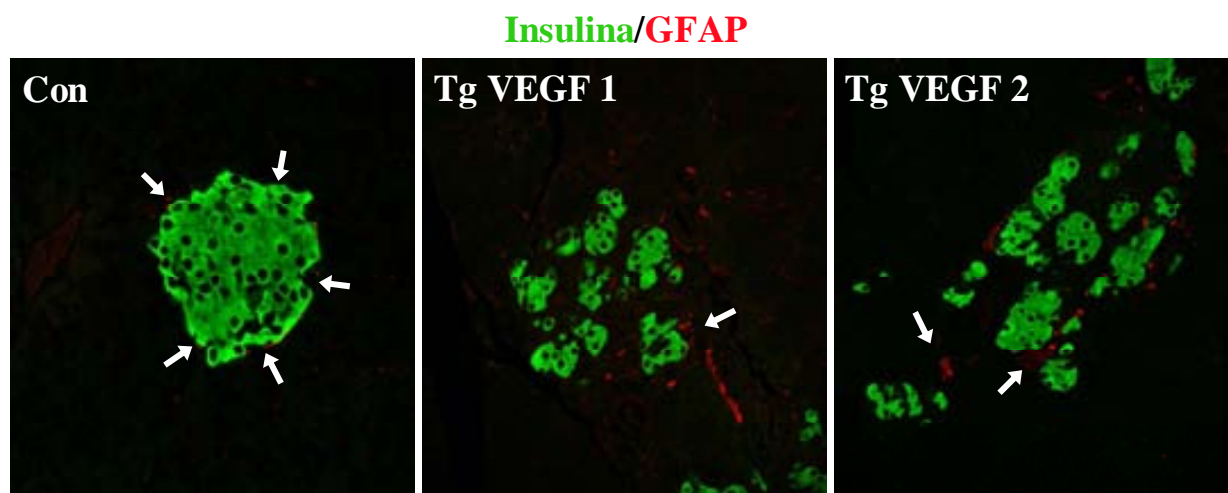


Figura 25. Anàlisi de la càpsula de cèl·lules de Schwann als illots d'animals transgènics a l'edat de dos mesos. Es va realitzar una doble tinció immunohistoquímica contra insulina (verd) i GFAP (vermell) en seccions de pàncrees d'animals controls i transgènics VEGF 1 i 2 a l'edat de dos mesos, tal i com s'explica a l'apartat de Materials i Mètodes. Magnificació x200.

3.3. Estudi de l'adhesió cel·lular i la matriu extracel·lular de l'illot.

La sobreexpressió de VEGF incrementava la vascularització dels illots en els ratolins transgènics, indicant un procés d'angiogènesi. L'angiogènesi implica el remodelatge de la matriu extracel·lular (ECM) dels vasos en creixement (Visse, 2003). Aquest procés requereix la degradació de l'ECM per les Metal·loproteïnases de la Matriu (MMPs) (Hiratsuka, 2002). S'ha descrit que VEGF induïx, a les cèl·lules endotelials, la producció d'algunes MMPs, com la MMP-2 (Wang, 1998).

Les cèl·lules β estan molt properes a la microcirculació dels illots per tal que els arribin els nutrients, i, puguin secretar les hormones al torrent sanguini (Ballian, 2007). A més, les cèl·lules β careixen d'ECM pròpia, de manera que requereixen de la membrana basal de les cèl·lules endotelials adjacents (Nikolova, 2006). Així doncs, la localització de les cèl·lules β podria estar lligada a la reestructuració de la vascularització.

Per tots aquests motius, la desorganització dels illots transgènics podia estar associada a canvis en la matriu extracel·lular dels vasos. En primer lloc, vam analitzar l'expressió de MMP-2 en illots controls i transgènics de les dues línies als dos mesos d'edat mitjançant Q-PCR. Els illots Tg VEGF 1 mostraven un increment de 16 vegades en l'expressió de la MMP-2 i els de la línia 2, de més de 12 vegades (Figura 26A). Aquest increment podia ser degut a la major quantitat de cèl·lules endotelials per illot però, també a un increment de l'expressió de MMP-2 a cada cèl·lula endotelial, ja que l'increment en l'expressió de PECAM-1 només era de 8 vegades a la línia 1 i de 5 vegades a la línia 2. En tot cas, hi havia una major producció de MMP-2, que si fos activa induïria el remodelatge de la matriu extracel·lular. Donat que les cèl·lules β es troben unides a la membrana basal de les cèl·lules endotelials, aquesta reestructuració podria ser la responsable de l'alteració en la distribució de les cèl·lules α i β dels illots Tg VEGF 1 i 2.

Per altra banda, les unions cèl·lula-cèl·lula són bàsiques, tant per la funcionalitat i comunicació entre les cèl·lules, com per l'organització dels diferents tipus cel·lulars dins l'illot. S'ha descrit que l'E-cadherina és una de les proteïnes d'adhesió intercel·lular principals en les unions homòlogues entre cèl·lules β (Dahl, 1996). En els illots dels ratolins Tg VEGF 1 i 2, s'observà una disminució important dels nivells d'E-cadherina per *Western blot* (Figura 26B).

S'ha relacionat el nivell d'expressió d'E-cadherina amb l'organització dels illots pancreàtics. Així, la inactivació de l'E-cadherina a les cèl·lules β en ratolins manipulats genèticament evita la unió de les cèl·lules β per formar illots, de manera que les cèl·lules β en aquests animals apareixen aïllades i disperses pel pàncrees (Dahl, 1996). També s'ha observat una disminució en E-cadherina en models animals amb illots desestructurats (Shih, 2002).

Les cèl·lules β , per una banda, es troben unides a la membrana basal dels vasos de l'illot i, per l'altra, estan unides entre elles a través de l'E-cadherina i, d'aquesta manera mantenen la seva localització dins del teixit. En canvi, en els illots dels ratolins transgènics, es donava un increment de MMP-2 que degradaria la membrana basal dels vasos juntament a una disminució de l'E-cadherina. Així doncs, les cèl·lules β dels animals Tg VEGF 1 i 2, presentarien un menor "ancoratge" a l'ECM i unió entre elles, fets que podrien explicar la desorganització dels illots.

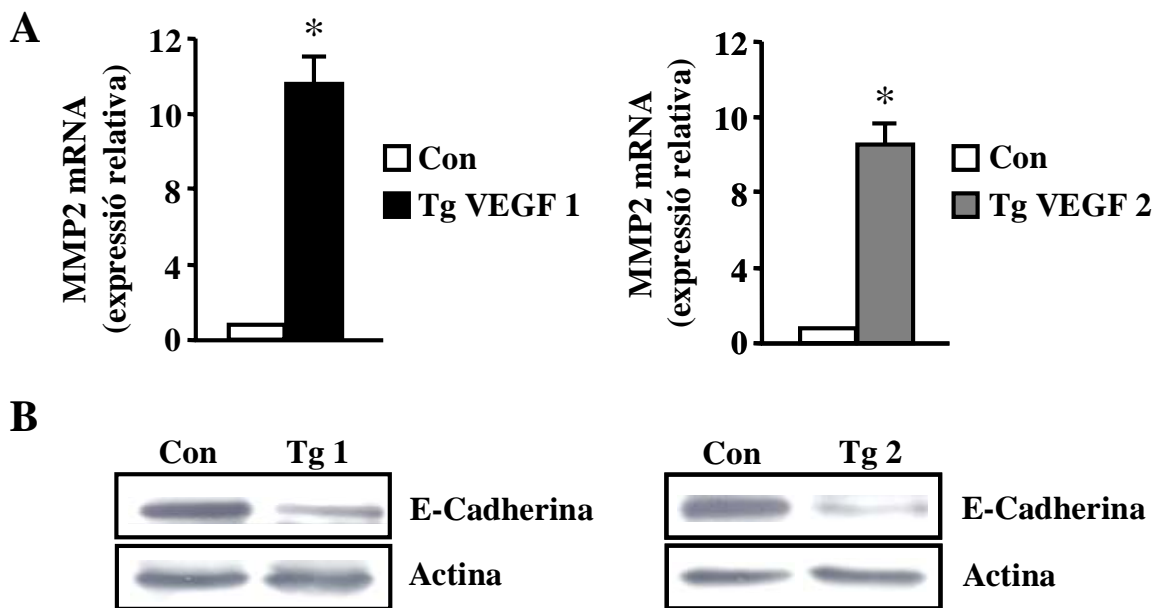


Figura 26. Estudi dels gens relacionats amb adhesió cel·lular i matriu extracel·lular. A) Anàlisi de l'expressió de MMP-2. Es va analitzar l'expressió de la metaloproteïnasa de tipus 2 o MMP2 mitjançant Q-PCR a partir d'extractes de RNA d'illots d'animals controls i transgènics d'ambdues línies. La quantitat de RNA es va normalitzar amb l'expressió del gen RBS i cada extracte va ser obtingut a partir dels illots de tres animals tal i com s'explica a l'apartat Materials i Mètodes. El resultat és la mitja \pm SEM de tres experiments independents. (* $P < 0,05$). **B) Determinació de l'expressió d'E-cadherina.** Es van determinar els nivells d'aquesta proteïna mitjançant Western-blot a partir d'extractes protèics d'illots d'animals controls i transgènics d'ambdues línies tal i com s'explica a l'apartat Materials i Mètodes. La quantitat de proteïna es va normalitzar amb els nivells d'actina. La proteïna E-cadherina corresponia a una banda de 124 KDa i l'actina, a una de 42 KDa.

3.4. Estudi morfomètric del pàncrees endocrí.

3.4.1. Determinació de la massa de cèl·lula β dels animals RIP-I/VEGF.

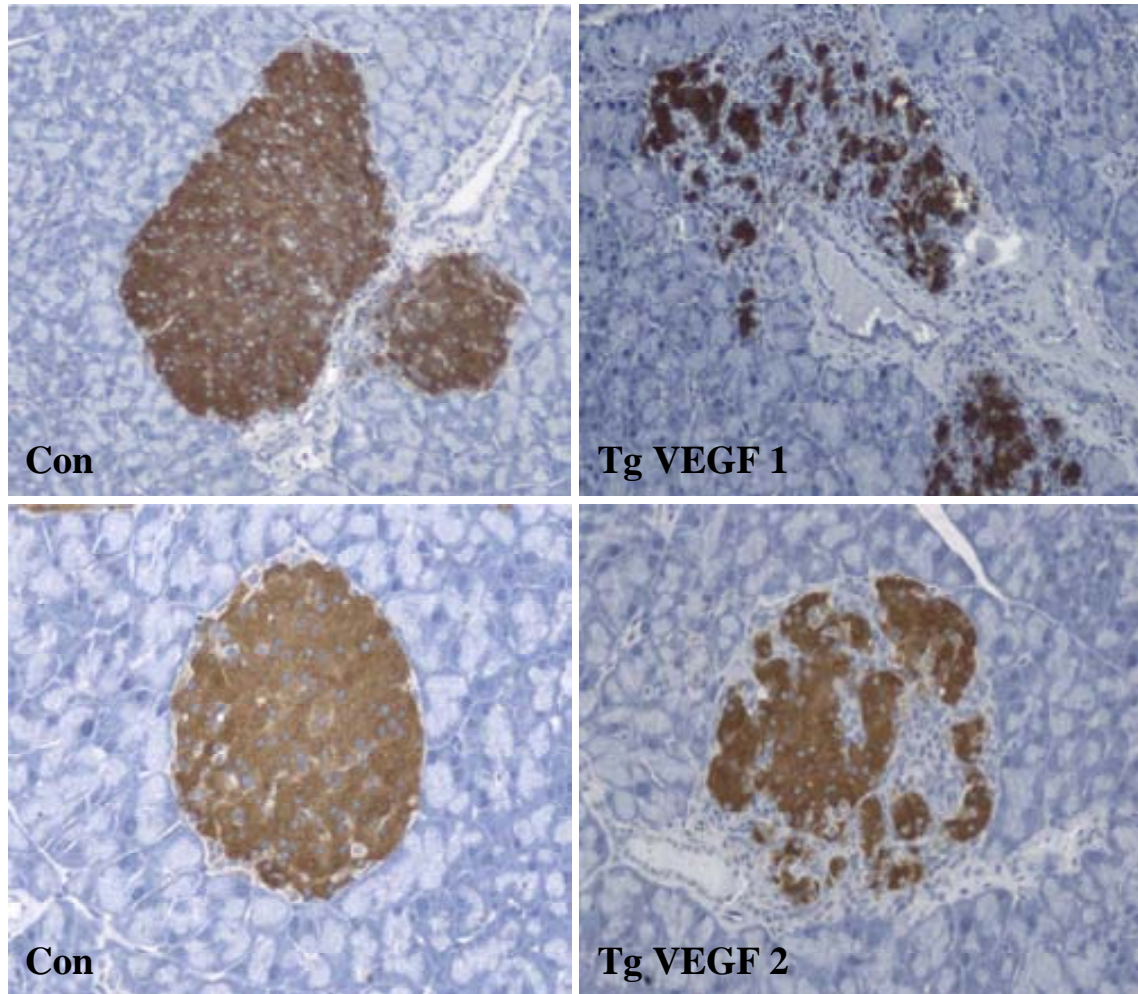
S'ha descrit que l'endoteli dels vasos del pàncrees produeix senyals que indueixen la formació dels illots durant el desenvolupament (Lammert, 2001). A més, VEGF és un important mitogen per les cèl·lules epitelials dels ductes pancreàtics i, són aquestes cèl·lules les que donen lloc a la neogènesi o formació de nous illots (Oberge-Welsh, 1997; Rooman, 1997). Així, l'increment en la quantitat de cèl·lules endotelials als illots dels animals transgènics RIP-VEGF i/o la sobreexpressió de VEGF, podria incrementar el nombre d'illots.

Així doncs, a continuació, es va mesurar la massa de cèl·lula β en animals controls i Tg VEGF 1 i 2 de 2 mesos d'edat, mitjançant una tinció immunohistoquímica anti-insulina (Figura 27A i B). No es van trobar diferències significatives entre controls i transgènics, de manera que la sobreexpressió de VEGF no causava un increment en la massa de cèl·lula β .

Un augment en la massa de cèl·lula β pot donar-se com a conseqüència d'un increment en el número d'illots (neogènesi), en el nombre de cèl·lules β per illot (hiperplàsia), o bé, per un major tamany de les cèl·lules β (hipertròfia) (Bonner-Weir, 2001). Així, per una determinada massa de cèl·lula β pot variar el nombre de cèl·lules β , i també l'àrea de cada cèl·lula. Per mesurar la hipertròfia, vam comptar el número de nuclis per àrea positiva per insulina de cada illot. La sobreexpressió de VEGF tampoc induïa diferències en l'àrea promig de les cèl·lules β en cap de les dues línies. Per tant, no presentaven hipertròfia o hipotròfia, ni tampoc, hiperplàsia o hipoplàsia (Taula 1).

VEGF és un factor mitogènic per les cèl·lules ductals, de manera que la sobreexpressió de VEGF podria, indirectament, afavorir la neogènesi a partir dels ductes. A més, per una determinada massa de cèl·lula β , pot haver-hi molts illots petits o pocs i grans. Així, també vam determinar el número d'illots/àrea de pàncrees (Taula 1) i no es van observar diferències, indicant que, possiblement, no augmentava la taxa de neogènesi en els ratolins transgènics.

A



B

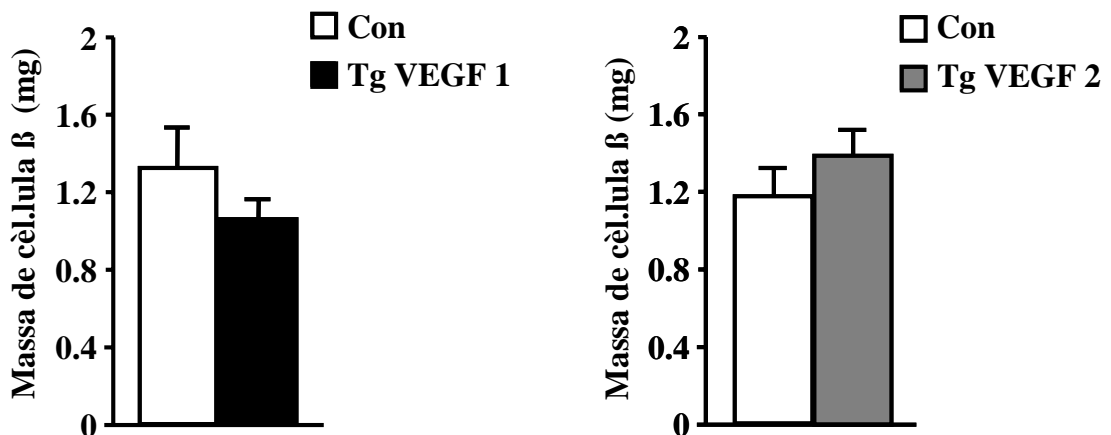


Figura 27. Anàlisi morfomètric del pàncreas endocrí dels animals controls i transgènics VEGF 1 i 2 als 2 mesos d'edat. **A)** Anàlisi immunohistoquímic contra insulina en animals controls i transgènics de cada línia. Es van realitzar tres talls histològics dels pàncreas de quatre animals per grup experimental (controls i transgènics de cada línia). En aquestes seccions, les cèl·lules β es van marcar amb un anticòs anti-insulina, tal i com s'indica a Materials i Mètodes (x200 augments per la línia 1 i x400 augments per la línia 2). **B)** Determinació de la massa de la cèl·lula β . La massa de cèl·lula β de les línies 1 i 2 es va determinar a partir de l'àrea positiva per insulina respecte l'àrea de pàncreas i el pes de l'òrgan, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. El resultat és la mitja \pm SEM de 4 animals per grup a la línia 1 i també a la línia 2. (* $P < 0,05$).

La única diferència entre animals controls i transgènics d'ambdues línies fou un increment de l'àrea promig dels illots en els animals transgènics: els illots dels animals Tg VEGF 1 mesuraven al voltant de $6300 \mu\text{m}^2$ i els dels ratolins Tg VEGF 2, tenien una àrea de $6000 \mu\text{m}^2$. En canvi, els illots dels animals controls tenien una àrea d'illot de $4000 \mu\text{m}^2$.

No obstant, l'àrea positiva per insulina dins de cada illot era la mateixa entre controls i transgènics, és a dir, els illots de tots els grups presentaven una mateixa àrea β , però els illots transgènics eren més grans, de manera que tenien una àrea no- β (no positiva per insulina) més gran. Així, mentre el percentatge d'àrea de cèl·lula β per àrea d'illot en els animals control era un 86%, en els illots els Tg VEGF 1 era de gairebé un 64% i en els Tg VEGF 2 era d'un 69%. Donat que els illots transgènics presentaven una zona més àmplia marcada amb l'anticòs contra col·lagen IV (Figura 20), l'increment en l'àrea no- β dels illots transgènics semblava degut a un augment en la vascularització insular.

| | Con | Tg VEGF 1 | Tg VEGF 2 |
|--|------------------|--------------------|--------------------|
| Massa de cèl·lula β (mg) | $1,27 \pm 0,13$ | $1,42 \pm 0,11$ | $1,18 \pm 0,1$ |
| Nº d'illots/àrea de pàncrees (mm^{-2}) | $1,42 \pm 0,1$ | $1,49 \pm 0,09$ | $1,56 \pm 0,1$ |
| Àrea promig de les cèl·lules β (μm^2) | $203,8 \pm 1,21$ | $200,65 \pm 2,02$ | $199,1 \pm 1,8$ |
| Àrea cèl·lules β /illot (μm^2) | $3185 \pm 126,9$ | $3256 \pm 208,4$ | $3856 \pm 241,3$ |
| Àrea cèl·lules β /àrea illot (%) | 84,5% | 62,9% * | 68,8% * |
| Àrea promig dels illots (μm^2) | $3990 \pm 273,8$ | $6333 \pm 478,2$ * | $5595 \pm 344,3$ * |

Taula 1. Anàlisi morfològic del pàncrees endocrí dels animals controls i transgènics RIP-I/VEGF 1 i 2 als 2 mesos d'edat. En tres talls histològics per cada animal i quatre animals per grup, es va mesurar l'àrea de cèl·lula β , l'àrea de pàncrees, l'àrea promig de la cèl·lula β , el número d'illots per secció i el número de ductes per secció. Es representa els valors promig dels controls de la línia 1 i de la línia 2, tal i com s'explica a l'apartat Materials i Mètodes. El resultat és la mitja \pm SEM de quatre animals en els transgènics de la línia 1 i de la línia 2 i de 8 animals pel grup control. (* $P < 0,05$).

La massa de cèl·lula β és el resultat de l'equilibri entre la mort i la formació de cèl·lules β . Per tant, encara que la massa de cèl·lula β no variava, la sobreexpressió de VEGF, l'increment de cèl·lules endotelials o la desorganització podien alterar l'índex de proliferació i el de d'apoptosi de les cèl·lules β .

3.4.2. Determinació de la taxa de replicació i d'apoptosi de la cèl·lula β .

A continuació, es va determinar la taxa de replicació de les cèl·lules β a l'edat de dos mesos mitjançant una doble tinció immunohistoquímica per la proteïna nuclear Ki67 i contra insulina i, no es van observar diferències significatives en l'índex de replicació de les cèl·lules β entre controls i transgènics de cap de les línies (Figura 28A).

La determinació de la taxa d'apoptosi es va realitzar mitjançant la tècnica del TUNEL combinada amb un marcatge contra insulina. Mitjançant aquesta tècnica, els nuclis de les cèl·lules apoptòtiques es detecten per la unió de nucleòtids marcats als fragments trencats del DNA, característica pròpia de les cèl·lules apoptòtiques. En aquest cas, tampoc no s'observaren diferències entre els animals controls i transgènics de cap de les dues línies (Figura 28B).

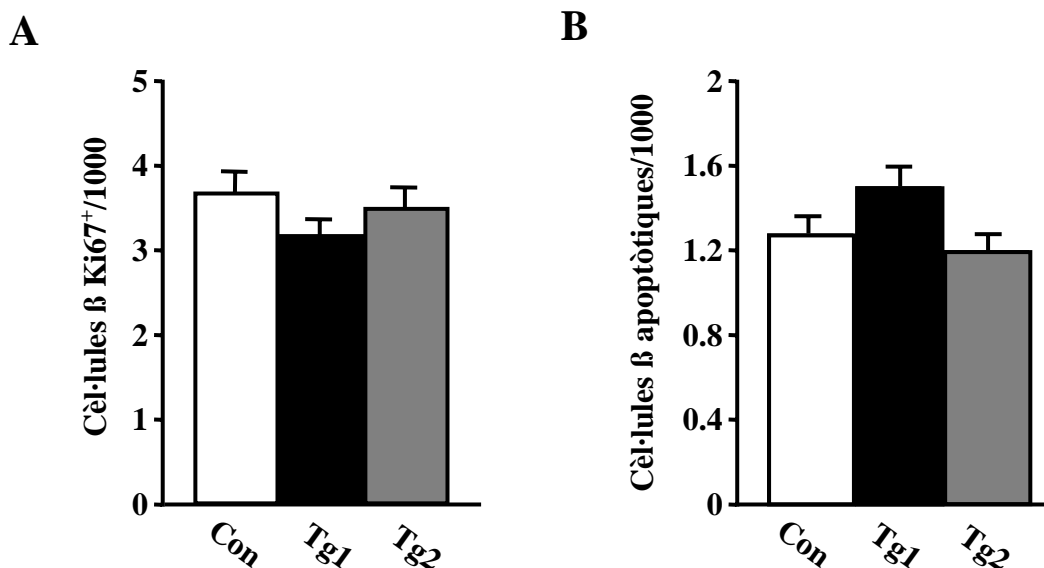


Figura 28. Anàlisi de l'índex de replicació i d'apoptosi de les cèl·lules β dels animals controls i transgènics VEGF 1 i 2 als 2 mesos d'edat. **A)** Determinació de la taxa de replicació de les cèl·lules β . El comptatge es va realitzar mitjançant la tinció de les cèl·lules β amb un anticòs anti-insulina i el marcador de cèl·lules en proliferació Ki67, **B)** Quantificació de l'apoptosi de les cèl·lules β . El comptatge es va realitzar mitjançant la tinció de les cèl·lules β amb un anticòs anti-insulina i marcant el DNA de les cèl·lules apoptòtiques amb la tècnica del TUNEL. Tant en la replicació com en l'apoptosi es van comptar més de 5000 nuclis en tres talls histològics de tres animals per grup, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. El resultat és la mitja \pm SEM de tres animals per grup. (*P<0,05).

Així doncs, la sobreexpressió de VEGF específicament a les cèl·lules β no va causar canvis en el nombre d'illots, ni en la massa de cèl·lula β , ni en la taxa de replicació o d'apoptosi en els animals Tg VEGF 1 i 2 als dos mesos d'edat. No obstant, els illots transgènics d'ambdues línies presentaven una distribució de les cèl·lules α i β i una vascularització alterada.

4. ESTUDI METABÒLIC DELS ANIMALS RIP-I/VEGF JOVES.

Els ratolins Tg VEGF 1 i 2 mostraven illots desestructurats, tant en la distribució α - β , com en la microcirculació. La desorganització dels illots, tant en la distribució de les cèl·lules endocrines com en la vascularització, s'ha relacionat amb alteracions en la secreció d'insulina (Tokuyama, 1995; Homo-Delarche, 2006). També s'ha descrit que la pèrdua d'E-cadherina disminueix la secreció d'insulina degut a una menor comunicació entre les cèl·lules β (Dahl, 1997; Shih, 2002; Bosco, 2007). Així doncs, per tal de comprovar si la desorganització dels illots transgènics portava a alteracions en la secreció d'insulina i a l'homeòstasi de la glucosa, es va realitzar un estudi metabòlic dels animals als dos mesos d'edat.

4.1. Determinació de la glucèmia i la insulinèmia.

Es va determinar la insulinèmia i la glucèmia en dos estats fisiològics: alimentació i dejuni, en ratolins controls i Tg VEGF 1 i 2, als dos mesos d'edat. No es van trobar diferències significatives en cap cas, de manera que els animals transgènics d'ambdues línies eren capaços de mantenir la glucèmia i la insulinèmia dins d'un rang de normalitat (Figura 29A i B).

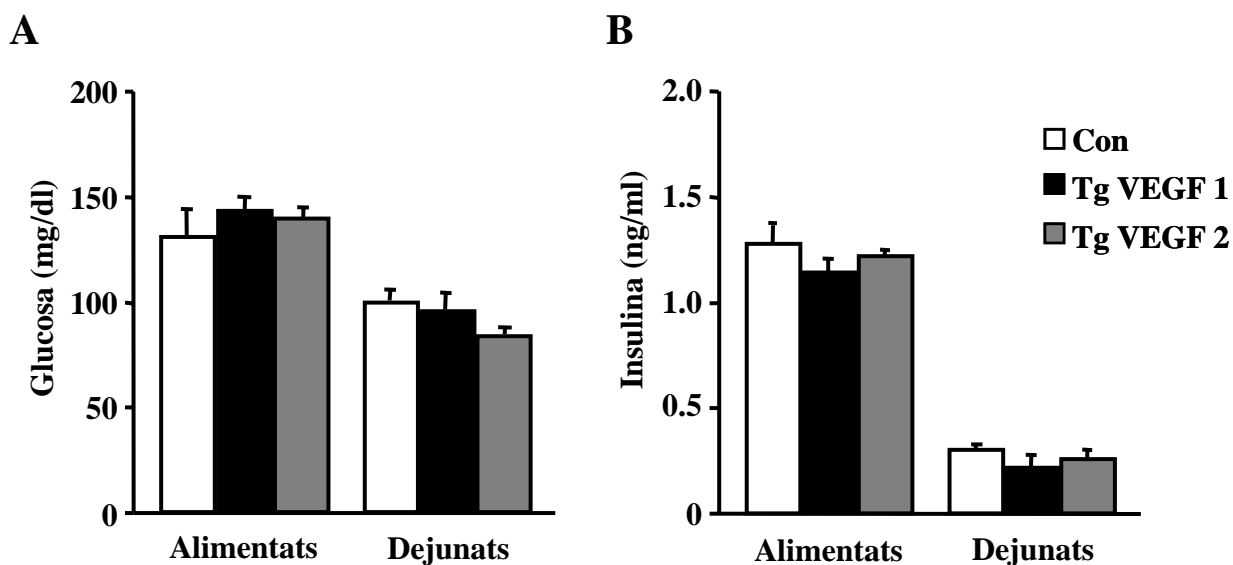


Figura 29. Glucèmia i insulinèmia dels ratolins VEGF 1 i 2. A) Les mesures de glucosa es van prendre en alimentació i després d'un dejuni de 16 hores en ratolins mascles de 2 mesos d'edat, controls i Tg VEGF 1 i 2, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els valors són la mitja \pm SEM de 12 animals per grup. B) Es va determinar la concentració d'insulina en sèrum dels ratolins control i transgènics VEGF 1 i 2 en alimentació i després d'un dejuni de 16 hores mitjançant un ELISA, tal i com s'explica a Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja \pm SEM de 12 animals Tg VEGF 1, 12 de VEGF 2 i 20 animals controls.

4.2. Estudi de la tolerància a la glucosa i de la secreció d'insulina *in vivo*.

També es va realitzar un estudi de la tolerància a una sobrecàrrega exògena de glucosa i, a la vegada, de la capacitat de secreció d'insulina *in vivo* en resposta a aquest secretagog. Així, es va administrar una dosi intraperitoneal de 2 g/kg de glucosa a ratolins controls i transgènics dejunats i es va mesurar la glucèmia i es va extreure sang per la cua, per tal de determinar la concentració sèrica d'insulina a diferents temps.

Tant els ratolins controls com els Tg VEGF 1 i 2, van mostrar una pujada ràpida de la glucèmia, que va arribar a valors superiors a 300 mg/dl en els primers 15 minuts després de la injecció. Posteriorment, la glucosa va disminuir de forma similar entre els dos grups de cada línia. En els valors d'insulina sèrica, també la resposta dels ratolins transgènics va ser molt similar a la dels controls. Així doncs, no hi havia alteracions en la secreció d'insulina ni en la captació de glucosa per part dels teixits perifèrics (Figura 30A i B). Per tant, al contrari del que s'havia descrit a la literatura, en els animals transgènics VEGF, la desorganització cel·lular i la desestructuració de la microcirculació dels illots, no donava lloc a una alteració en la secreció d'insulina *in vivo* ni tampoc en l'homeòstasi de la glucosa.

Tot i que a l'edat de dos mesos, els animals transgènics mostraven normoglicèmia i normoinsulinèmia, vam realitzar, a continuació, un seguiment del fenotip metabòlic i morfològic del pàncrees endocrí amb l'edat, ja que la sobreexpressió crònica de VEGF podria incrementar les alteracions morfològiques i vasculars en els illots transgènics, així com el seu funcionament i, com a conseqüència, l'homeòstasi de la glucosa.

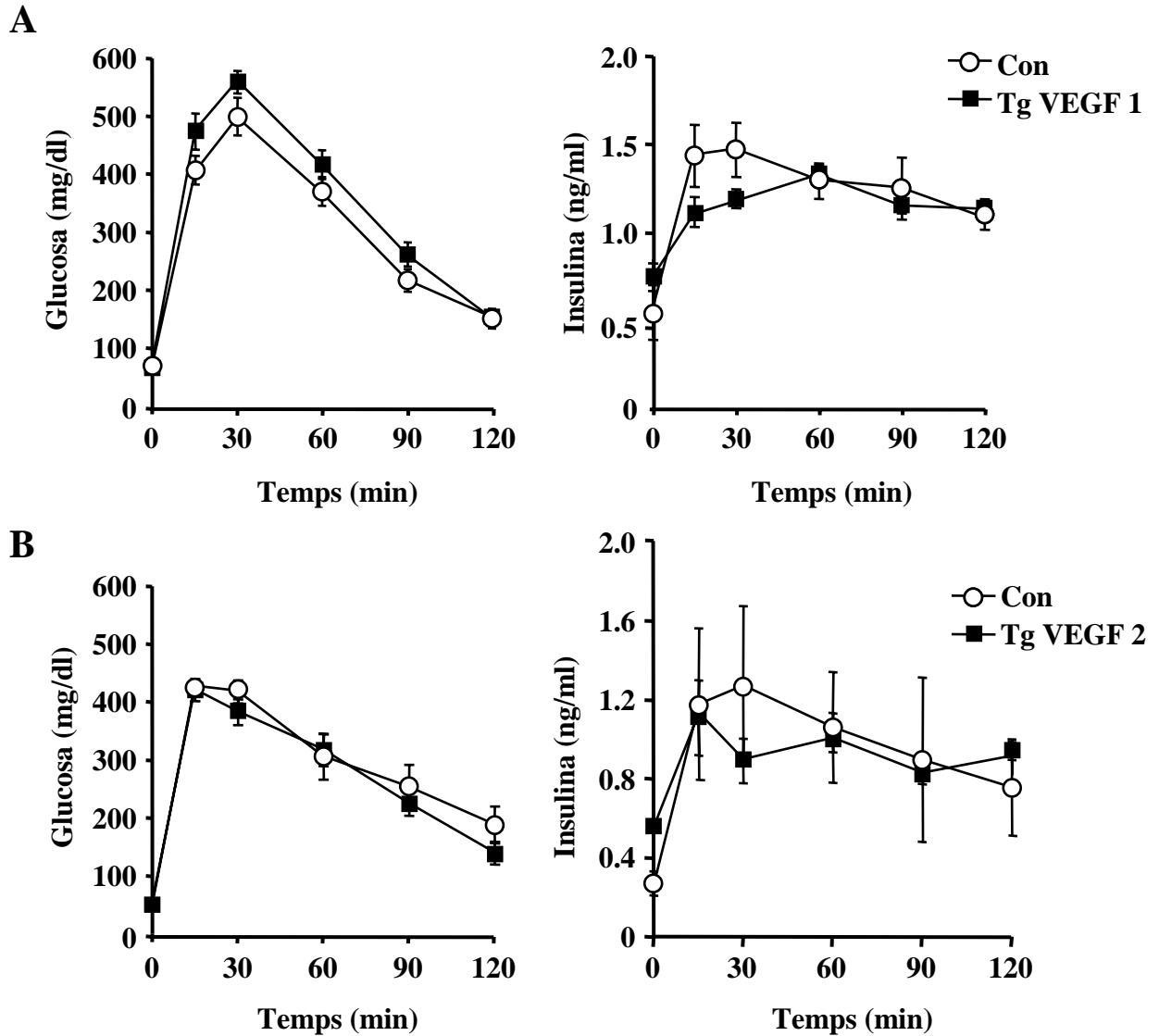


Figura 30. A) Test intraperitoneal de tolerància a la glucosa i estudi de la secreció d'insulina *in vivo* en animals Tg VEGF 1. En animals dejunats de la línia 1 de 2 mesos d'edat, es van injectar 2 g glucosa/kg de pes i es van obtenir mostres de sèrum per realitzar un seguiment de les glucèmies i les insulinèmies a diferents temps, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. No es van observar diferències entre controls i transgènics VEGF 2. El resultat és la mitja±SEM de vuit animals per grup. **B) Test intraperitoneal de tolerància a la glucosa i estudi de la secreció d'insulina *in vivo* en animals Tg VEGF 2.** En animals dejunats de 2 mesos d'edat, es van injectar 2 g glucosa/kg de pes i es van obtenir mostres de sèrum per realitzar un seguiment de les glucèmies i les insulinèmies a diferents temps, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. El resultat és la mitja±SEM de vuit animals per grup.

5. EVOLUCIÓ DEL FENOTIP DELS ANIMALS Tg VEGF 1 AMB L'EDAT.

5.1. Seguiment de la glucèmia i la insulinèmia en els animals Tg VEGF 1.

Els ratolins Tg VEGF 1, a l'edat de dos mesos, presentaven una glucosa i una insulina sèrica similar als seus germans controls i, aquests valors es mantien fins a l'edat de 7 mesos. No obstant, a partir d'aquesta edat, els animals Tg VEGF 1 mostraven de forma espontània i sobtada una elevada hiperglucèmia (Figura 31A). Així, a l'edat de 8 mesos, el 80% dels animals mostraven una glucèmia superior a 400 mg/dl i, a l'edat de 12 mesos, el 100% dels animals eren diabètics oberts. La hiperglucèmia en aquests animals va anar acompanyada de valors d'insulinèmia significativament més baixos respecte els controls (Figura 31B).

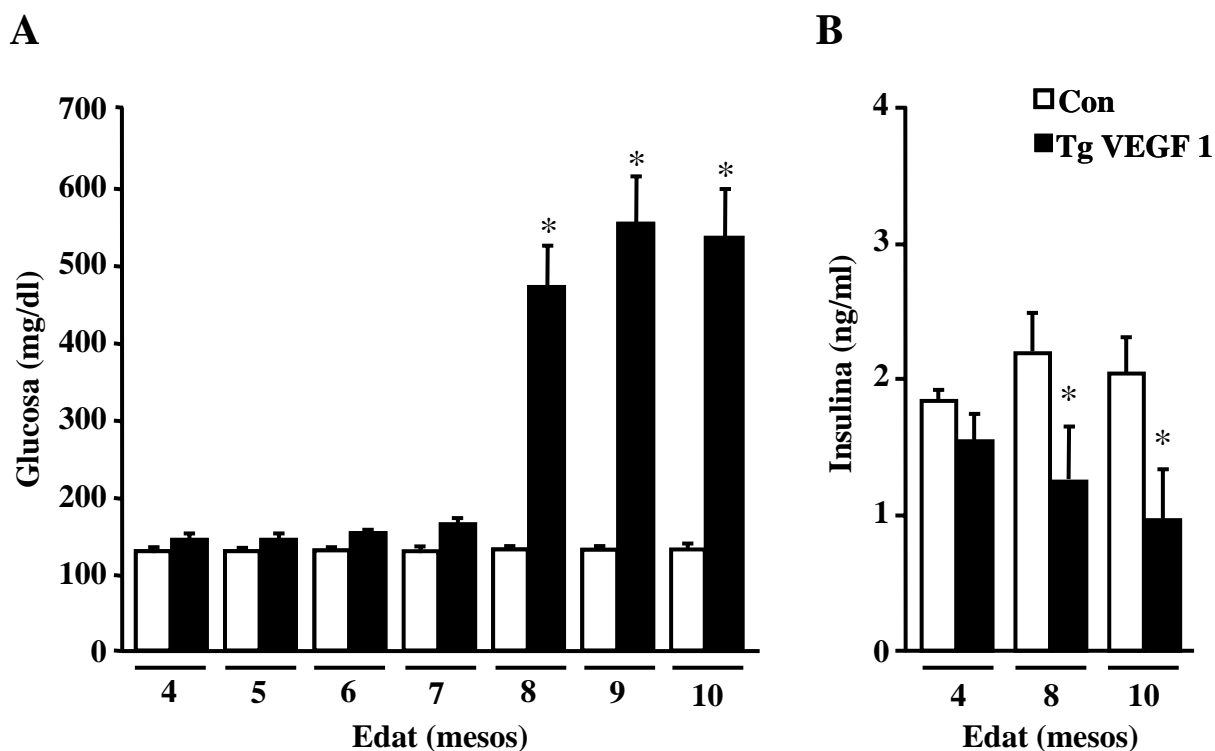


Figura 31. Seguiment dels nivells de glucosa i insulina sèriques en els animals Tg VEGF 1 al llarg del temps. **A) Determinació de la glucèmia.** En els animals de la línia 1 es va mesurar la concentració sèrica de glucosa a partir de sang obtinguda de la cua en diferents moments de la seva vida. Les mesures es realitzaven a primera hora de matí i en estat d'alimentació, tal i com s'explica a Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja \pm SEM de 16 animals per grup (* $p < 0,05$). **B) Determinació de la insulinèmia.** Es va mesurar la concentració sèrica d'insulina en els animals de la línia 1 en diferents moments de la seva vida. Les mesures es van realitzar a mostres de sang obtingudes per la vena de la cua mitjançant ELISA, sempre a primera hora de matí i en estat d'alimentació, tal i com s'explica a Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja \pm SEM de 16 animals per grup (* $p < 0,05$).

5.2. Estudi de la tolerància a la glucosa i la secreció d'insulina en els animals Tg VEGF 1 als 5 mesos.

Amb l'objectiu d'estudiar si el procés diabètic anava precedit d'un període amb una funcionalitat alterada dels illots, es va realitzar un test de tolerància a la glucosa i es va mesurar en paral·lel la secreció d'insulina, en ratolins controls i Tg VEGF 1 a l'edat de 5 mesos. Es va observar una disminució en la secreció d'insulina i una intolerància a la glucosa. Durant el test, els ratolins transgènics van arribar a nivells de glucèmia significativament més alts que els controls i van mostrar una secreció d'insulina significativament menor (Figura 32A i B). Així, als 5 mesos d'edat, moment previ a l'aparició de la hiperglucèmia diabètica, els ratolins Tg VEGF 1 eren normoglucèmics i normoinsulinèmics, però intolerants a la glucosa.

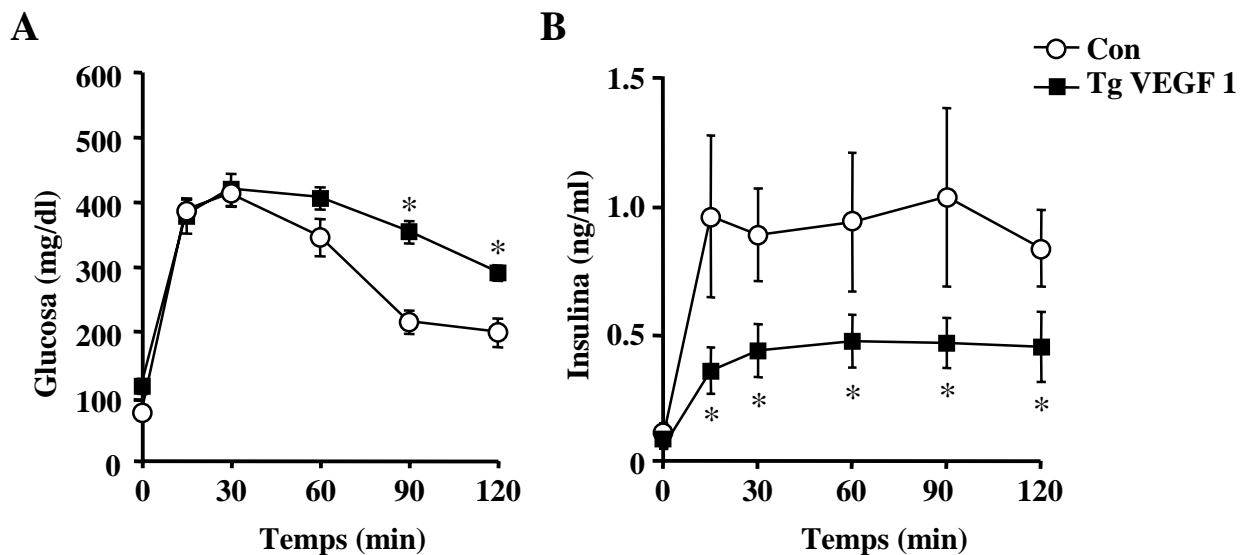


Figura 32. Estudi de la tolerància a la glucosa i la secreció d'insulina *in vivo* en els animals VEGF 1. A) Test de tolerància a la glucosa i B) secreció d'insulina *in vivo*. Es va dur a terme un test de tolerància a la glucosa injectant intraperitonealment una dosi de glucosa de 2 g/kg en animals de 5 mesos de VEGF 1. Es va mesurar la glucèmia i la insulinèmia mitjançant un ELISA. La sang per a la determinació de la glucosa i la insulina es va obtenir als minuts 0 (abans de la injecció de glucosa), 15, 30, 60 i 90 després de la injecció a partir de la cua. Els resultats són la mitja \pm SEM de 8 animals per grup (* $P < 0,05$).

5.3. Anàlisi morfològica dels illots dels animals Tg VEGF 1 al llarg del temps.

5.3.1. Anàlisi de la distribució de les cèl·lules endocrines de l'illot.

Es va determinar la distribució de les cèl·lules α i β a les edats de 5 i 8 mesos, mitjançant tincions immunohistoquímiques dobles contra insulina i glucagó. Es van triar animals de 5 mesos perquè, a aquesta edat, els ratolins Tg VEGF 1 mostraven intolerància a la glucosa i una disminució en la secreció d'insulina. També es va realitzar aquest estudi a l'edat de 8 mesos perquè era el moment en que esdevenien diabètics oberts.

Al cinquè mes de vida, els illots transgènics apareixien amb una distribució totalment alterada, amb les cèl·lules α distribuïdes per tot l'illot, similarment a com ho estaven a l'edat de dos mesos. Per contra, en el pàncrees dels animals Tg VEGF 1 de 8 mesos no s'hi van observar illots, sinó cèl·lules α i cèl·lules β aïllades o en petits grups de dos o tres cèl·lules, que apareixien disperses pel pàncrees (Figura 33). A més, els animals transgènics mostraven una disminució important del nombre de cèl·lules β , mentre que el de cèl·lules α semblava mantenir-se.

5.3.2. Anàlisi de la vascularització dels illots.

Per tal d'analitzar la morfologia de la vascularització dels illots es va realitzar una doble tinció immunohistoquímica amb un anticòs contra insulina i un altre contra col·lagen IV. Així, en els animals transgènics de 5 mesos, els illots mostraven una acumulació de cèl·lules amb una matriu extracel·lular molt rica en col·lagen IV, suggerint que es tractava de cèl·lules endotelials. (Figura 34). Aquest increment en la quantitat d'endoteli als illots dels animals Tg VEGF 1 era similar al que ja es va descriure als dos mesos d'edat.

En els ratolins transgènics de 8 mesos, les cèl·lules β no estaven agrupades, sinó que apareixien disperses i totalment envoltades per cèl·lules amb una ECM positiva per col·lagen IV. Així doncs, probablement es tractava de cèl·lules endotelials (Figura 34). A les imatges obtingudes semblava que les cèl·lules endotelials havien envaït els illots i els havien disgregat, separant les cèl·lules β entre elles.

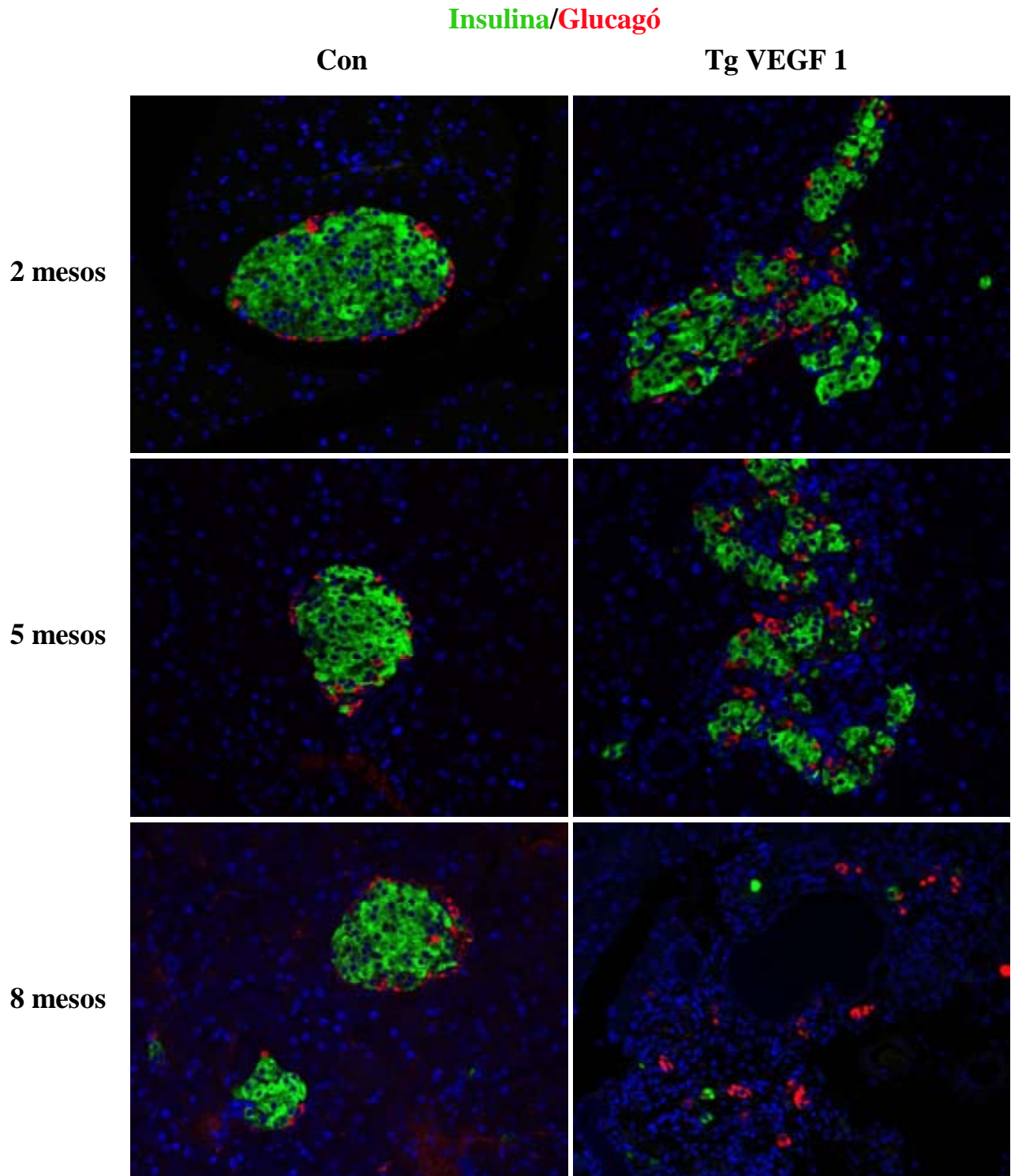


Figura 33. Determinació de la distribució de les cèl·lules α i β dels illots d'animals VEGF 1 a diferents edats. Seccions de pàncrees d'animals controls i transgènics VEGF 1 de 2, 5 i 8 mesos es van incubar amb anticossos contra insulina (verd) i contra glucagó (vermell) per tal d'analitzar la distribució de les cèl·lules α i β , tal i com s'indica l'apartat Materials i Mètodes. Magnificació x200.

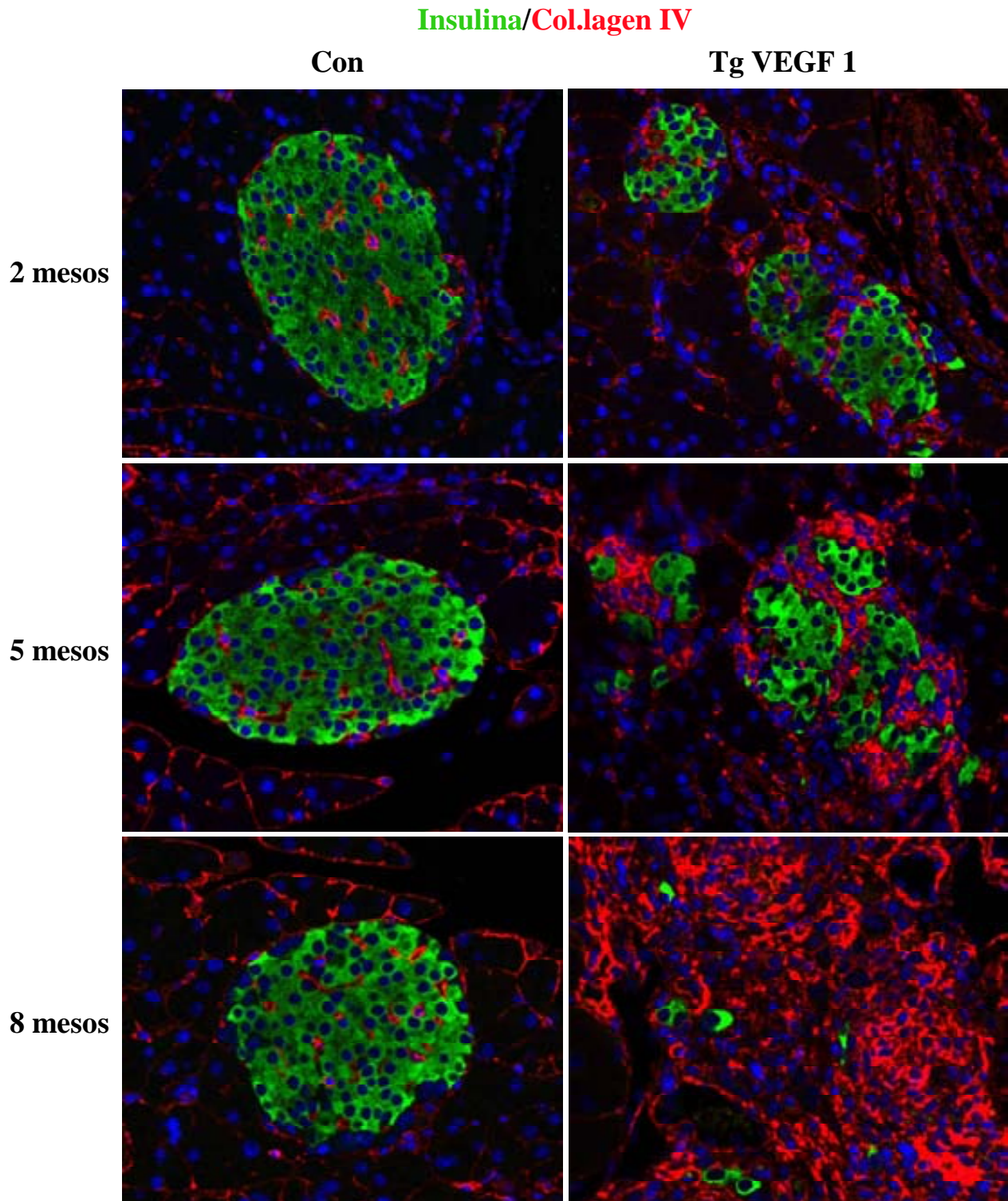


Figura 34. Anàlisi de la vascularització insular. Seccions de pàncrees d'animals controls i transgènics de 2, 5 i 8 mesos d'edat VEGF 1 es van incubar amb un anticòs contra insulina (verd) i un altre contra col·lagen IV (vermell), tal i com s'explica a l'apartat Materials i Mètodes. Magnificació x400.

5.4. Determinació de la massa de cèl·lula β de la línia 1 als 8 mesos.

A continuació, es va determinar la massa de cèl·lula β en ratolins controls i Tg VEGF 1 de 8 mesos. Es va determinar que els ratolins transgènics presentaven una reducció de més del 70 % de la massa de cèl·lula β respecte els controls (Figura 35 A i B).

La massa de cèl·lula β dels animals transgènics de 8 mesos era molt menor que la dels controls de la mateixa edat i, també respecte la massa de cèl·lula β dels Tg VEGF 1 a l'edat de dos mesos. Per tant, això indicava que havia tingut lloc una pèrdua de cèl·lules β . Així doncs, vam estudiar si el mecanisme principal d'aquesta pèrdua de cèl·lules β era un increment en la taxa d'apoptosi, mitjançant la tècnica del TUNEL amb una co-tinció contra insulina. Tant en els pàncrees controls com en els transgènics es va detectar aproximadament 1 cèl·lula β apoptòtica de cada 100 cèl·lules β , de manera que els valors no van ser estadísticament diferents entre grups. Per tant, els illots dels animals Tg VEGF 1 de 8 mesos d'edat no mostraven un increment en l'índex d'apoptosi de les cèl·lules β (Figura 35C). Aquest resultat podia suggerir la mort no havia tingut lloc pel mecanisme de l'apoptosi, sinó per necrosi. També podria ser degut a que l'onada d'apoptosi s'hagués donat anteriorment a l'edat de la quantificació.

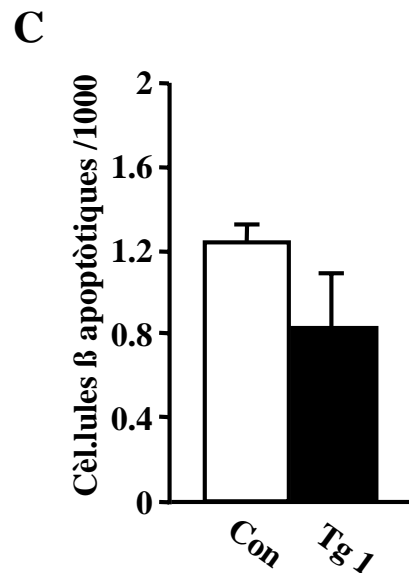
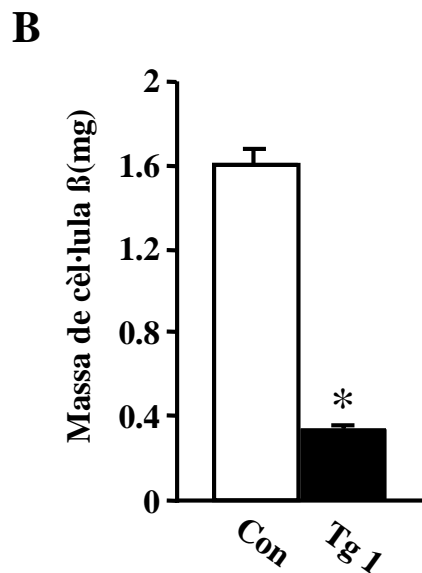
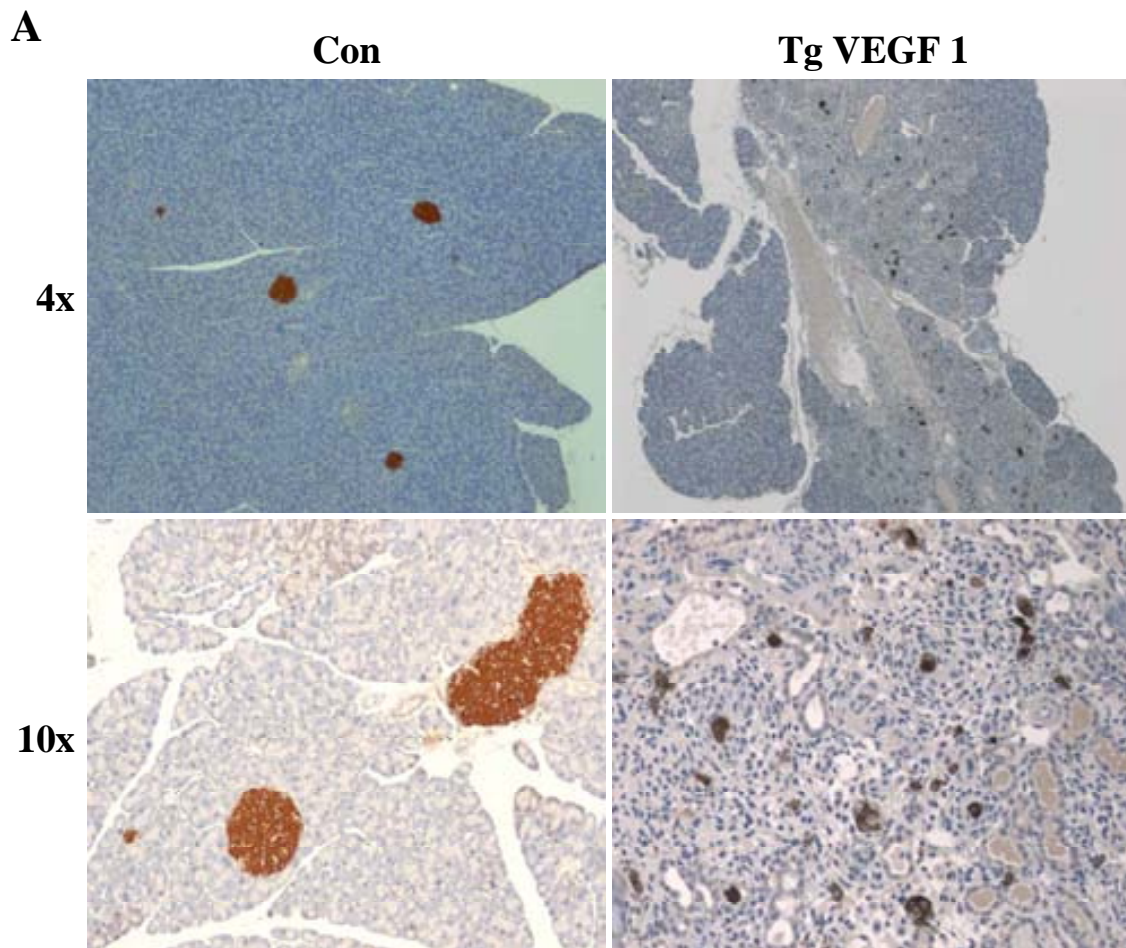


Figura 35. A) Tinció immunohistoquímica contra insulina en pàncrees d'animals VEGF 1 als 8 mesos. Es va realitzar una tinció immunohistoquímica amb un anticòs contra insulina en seccions de pàncrees d'animals controls i Tg VEGF 1 de 8 mesos, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. **B) Determinació de la massa de cèl·lula β .** Es va determinar la massa de cèl·lula β pancreàtica dels ratolins control i Tg VEGF 1 de 8 mesos d'edat. La determinació es va dur a terme tal i com s'explica a Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja \pm SEM de 4 animals per grup (*ratolins transgènics respecte controls, * $P < 0.05$). **C) Determinació de la taxa d'apoptosi de la cèl·lula β .** Mitjançant una tinció contra insulina es van marcar les cèl·lules β i amb la tècnica del TUNEL es van marcar les cèl·lules apoptòtiques. Es van comptar més de 5000 cèl·lules per animal en tres animals per grup experimental tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja \pm SEM.

5.5. Estudi del procés inflamatori en el pàncrees dels animals Tg VEGF 1.

La principal funció del factor VEGF és activar processos d'angiogènesi i incrementar la permeabilitat dels vasos (Byrne, 2005; Carmeliet, 2005; Ferrara, 2005). No obstant, també se li han adjudicat altres funcions, i d'entre elles, cal destacar el seu efecte com a molècula pro-inflamatòria.

Un teixit inflammat secreta VEGF i aquest actua sobre l'endoteli activant l'expressió de molècules que permeten l'adhesió de leucòcits (Camacho, 2001). A més, VEGF incrementa la permeabilitat dels vasos perquè tingui lloc l'extravasació dels leucòcits cap al teixit. VEGF també activa les cèl·lules endotelials perquè secretin citocines pro-inflamatòries com: IL-6 (interleuquina 6) i MCP-1 (factor quimiotàctic de macròfags-1). Per altra banda, els monòcits/macròfags expressen el receptor VEGFR-1, de manera que VEGF indueix quimiotaxis sobre aquestes cèl·lules, directament a través d'aquest receptor i, indirectament, activant la producció de MCP-1 a les cèl·lules endotelials. Per tant, VEGF té un paper clau en les respostes immunes innates.

Una inflamació en el pàncrees afectaria la supervivència i la funcionalitat dels illots. Així, s'ha descrit que diverses citocines pro-inflamatòries disminueixen la viabilitat de les cèl·lules β i inhibeixen la secreció d'insulina (Eizerik, 1994; Eizerik, 2001; Cnop, 2005).

En els animals transgènics de cinc mesos d'edat, la sobreexpressió de VEGF als illots de Langerhans portava a una disminució en la secreció d'insulina i, en els animals de vuit mesos, donava lloc a una pèrdua de la massa de cèl·lula β . Donat que les cèl·lules β no expressen els receptors de VEGF, aquest efecte sobre les cèl·lules β havia de ser indirecte i podia ser conseqüència de l'activitat pro-inflamatòria del VEGF. Per tot això, vam estudiar si es donava un procés inflamatori que pogués explicar la disminució de la funcionalitat dels illots i, posteriorment, la disminució de la massa de cèl·lula β .

5.5.1. Caracterització de cèl·lules inflamatòries en el pàncrees dels Tg VEGF 1.

Es va determinar la presència de cèl·lules inflamatòries al pàncrees d'animals controls i Tg VEGF 1. Amb aquest objectiu, es realitzà una doble tinció immunohistoquímica contra insulina i contra CD45 o LCA (*Leukocyte common antigen*), que és un marcador de leucòcits (Abbas, 2000), en talls histològics d'animals controls i transgènics de 5 i de 8 mesos. En els illots de tots els ratolins transgènics, s'hi van observar cèl·lules marcades amb l'anticòs contra CD45, mentre que en els pàncrees controls, tant de 5 com de 8 mesos, no se n'hi van detectar. A més, el nombre de cèl·lules CD45 positives en els pàncrees dels ratolins transgènics diabètics de 8 mesos va ser encara major que a l'edat de cinc mesos (Figura 36).

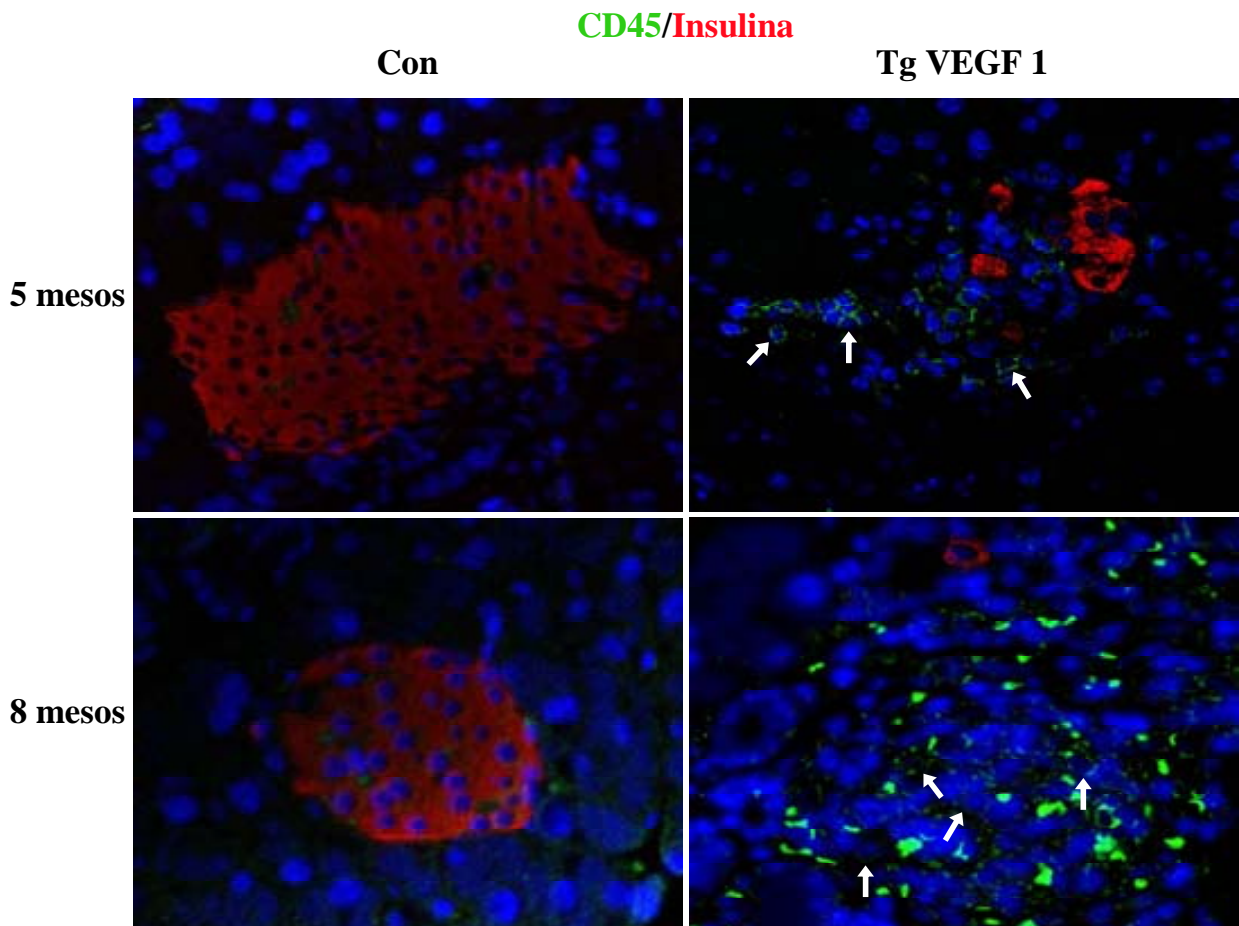


Figura 36. Determinació de la infiltració en els pàncrees dels animals Tg VEGF 1. Amb l'objectiu de detectar cèl·lules infiltrants en els pàncrees dels animals transgènics de la línia 1 de 5 i 8 mesos es va realitzar una doble tinció immunohistoquímica per insulina (vermell) i CD45 (verd), que és un marcador de leucòcits, en seccions de pàncrees controls i transgènics, tal i com s'indica a l'apartat Materials i Mètodes. Magnificació x400 als 5 mesos i x600 als 8 mesos. A l'edat de 8 mesos s'observen múltiples cèl·lules amb senyal positiva per CD45 a la membrana plasmàtica envoltades de cèl·lules verdes autofluorescents sense nucli que corresponen a eritròcits.

Per tal de caracteritzar de quin tipus de leucòcit es tractava, es va dur a terme una doble tinció immunohistoquímica contra F4/80, proteoglicà de membrana propi dels macròfags (Austin, 1981), i contra insulina. Només es van detectar cèl·lules F4/80⁺ en els illots transgènics. El nombre d'aquestes cèl·lules era major a l'edat de 8 mesos que a la de 5 mesos (Figura 37).

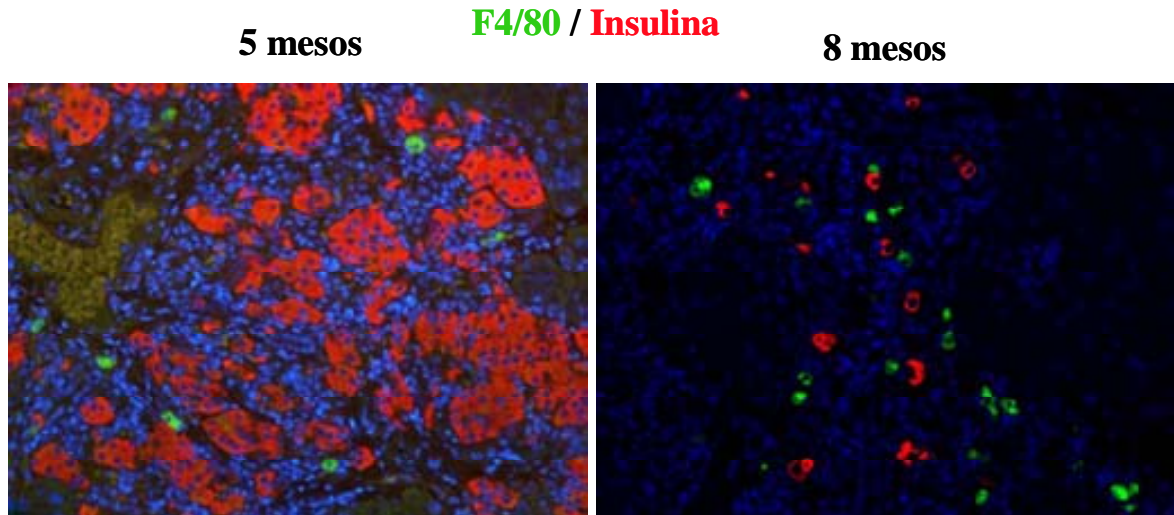


Figura 37. Anàlisi de la infiltració en els pàncrees dels animals Tg VEGF 1. Tinció immunohistoquímica doble per insulina (vermell) i F4/80 (verd), un marcador de macròfags, en animals transgènics de 5 i 8 mesos. Magnificació x200. Les anàlisis immunohistoquímiques es van realitzar tal i com s'indica a Materials i Mètodes.

Els macròfags secreten òxid nítric (NO) i radicals lliures per tal d'induir la mort de les cèl·lules diana i, per tant, expressen l'enzim òxid nítric sintasa induïble (iNOS). Vam realitzar una tinció immunohistoquímica contra aquest enzim. Mentre no es van trobar cèl·lules positives per aquest marcatge en els animals controls, sí se'n van observar als ratolins transgènics de cinc mesos i, més freqüentment als 8 mesos. La morfologia d'aquestes cèl·lules suggeria que es podia tractar de macròfags, no obstant, les cèl·lules positives per iNOS no semblaven tan abundants com les F4/80 (Figura 38).

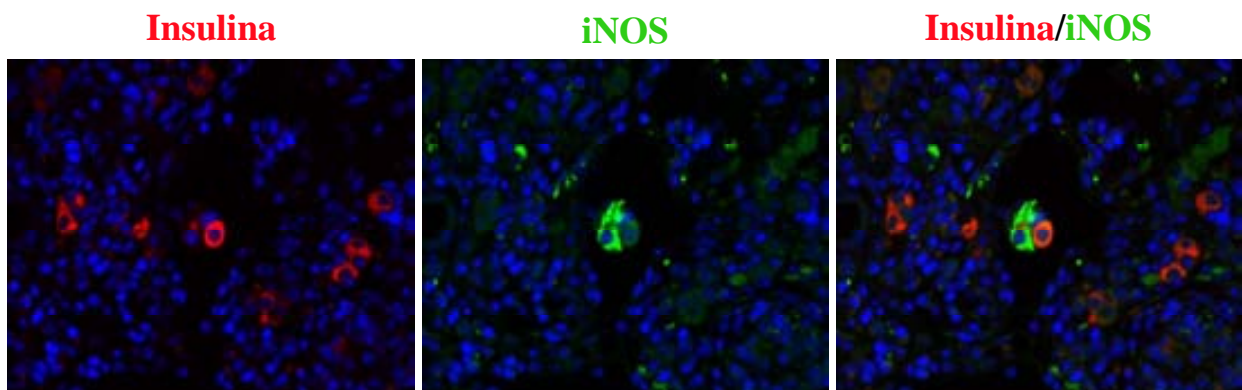


Figura 38. Anàlisi de l'expressió d'iNOS als Tg VEGF 1. En seccions de pàncrees de ratolins Tg VEGF 1, es va realitzar una doble tinció immunohistoquímica contra insulina (vermell) i iNOS (verd), tal i com s'indica a l'apartat Materials i Mètodes. Magnificació 400x.

A continuació, vam caracteritzar els tipus leucocitaris mitjançant la una anàlisi per FACS (*Fluorescence Analysis Cell Sorting*) dels animals controls i transgènics VEGF 1 als 8 mesos d'edat, moment en que presentaven una glucèmia entre 350 mg/dl i 450 mg/dl.

Així, els pàncrees de tres animals controls i tres transgènics van ser perfosos i digerits amb col·lagenasa P. Una vegada el teixit estava totalment disgregat, es va rentar amb una solució sense col·lagenasa i amb EDTA. Les unions entre cèl·lules β (com les degudes a l'E-cadherina) són Ca^{2+} -depenents, de manera que, l'EDTA afavoria la separació de les cèl·lules dels illots i permetia l'alliberació de leucòcits infiltrants. No es van obtenir extractes d'illots aïllats, perquè en aquest moment, aquests animals no presentaven illots sinó que les cèl·lules β apareixen disperses pel teixit i envoltades de cèl·lules infiltrants.

Diferents fraccions dels extractes es van incubar amb els diferents anticossos: contra CD11b (marcador de macròfags), contra CD11c (de cèl·lules dendrítiques), contra CD19 (de limfòcits B), contra CD4 (de limfòcits T *helper*), contra CD8 (de limfòcits T citotòxics) (Abbas, 2000) i contra IgG (que no hauria de reconèixer cap antigen dels extractes i es va utilitzar com a control d'hibridacions inespecífiques). Es van rentar els extractes i es van fer passar pel citòmetre de flux. Els resultats que es van obtenir es van representar a la Figura 39 com increment de cèl·lules positives per un marcador determinat en els pàncrees transgènics respecte els controls. Es va observar un increment generalitzat en tots els tipus cel·lulars leucocitaris estudiats, encara que l'augment més significatiu va correspondre als macròfags i, als limfòcits B i als T CD8⁺.

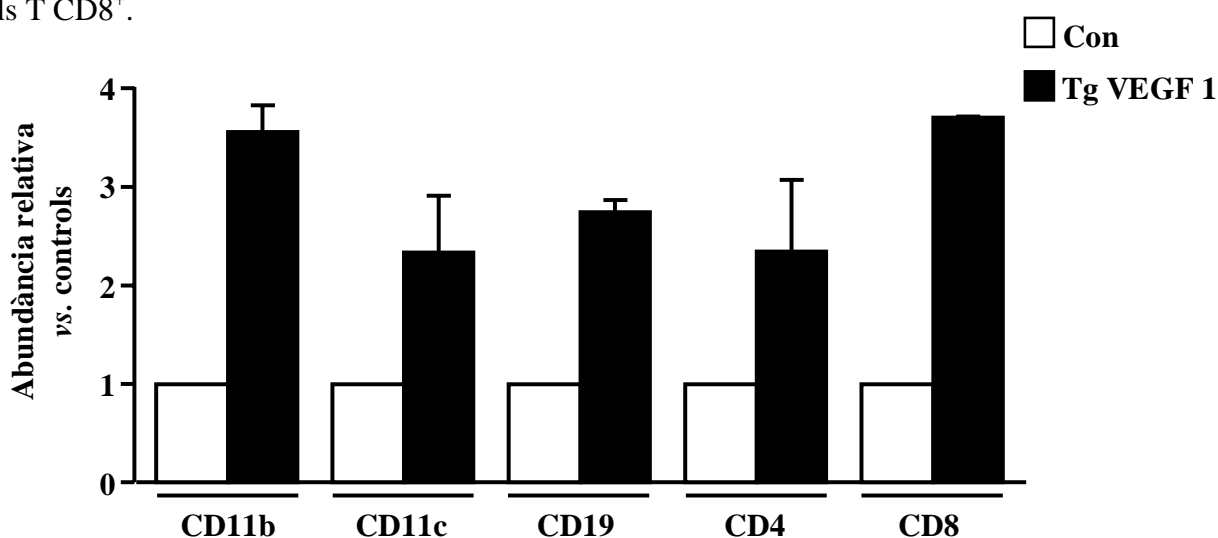


Figura 39. Anàlisi per citometria de flux dels leucòcits infiltrants en els pàncrees dels animals diabètics dels animals VEGF 1. Es van obtenir extractes pancreàtics de tres animals controls i tres transgènics per separat i es van incubar amb diferents anticossos marcadors de diferents leucòcits, tal i com s'explica a Materials i Mètodes. CD11b (macròfags), CD11c, (cèl·lules dendrítiques), CD19, (limfòcits B), CD4, (limfòcits Th) i CD8 (limfòcits Tc).

Així doncs, amb l'edat, els ratolins Tg VEGF 1 desenvolupaven un procés inflamatori en el pàncrees. Aquesta inflamació podia ser conseqüència de l'abundant presència de cèl·lules endotelials, que sotmeses a altes concentracions de VEGF, estaven en un estat d'activació i, per tant, secretaven citocines inflamatòries. La presència de citocines i de cèl·lules immunes portarien a la disfunció del pàncrees endocrí i la pèrdua de massa de cèl·lula β . No obstant, la inflamació, podia ser també deguda a la mort de les cèl·lules β , de manera que les cèl·lules apoptòtiques reclutessin macròfags i aquests produïssin citocines.

5.5.2. Determinació de l'expressió de citocines i marcadors d'infiltració a Tg VEGF 1.

La infiltració leucocitària va acompanyada de la producció de citocines. Les citocines són desencadenants de la infiltració de cèl·lules immunes i, a la vegada, aquests infiltrats produeixen citocines (Abbas, 2000; Anderson, 2005). A més, l'endoteli vascular participa activament en les respostes inflamatòries, expressant molècules que permeten la migració i l'entrada de leucòcits als teixits i també secretant algunes citocines pro-inflamatòries (Schmid-Schönbein, 2006). Per exemple, l'endoteli expressa MCP-1 i IL-6 en resposta a altres citocines com IL-1 β , TNF- α i IFN- γ i, també, en resposta a VEGF (Yamada, 1996; Mackay, 2001). Així, una vegada demostrada la presència de macròfags en els pàncrees dels animals Tg VEGF 1, el següent pas va ser determinar l'expressió de diverses citocines. Per fer-ho es van obtenir extractes de RNA a partir de porcions de pàncrees d'animals controls i transgènics de 8 mesos d'edat. Mitjançant la tècnica de la PCR quantitativa es va mesurar els nivells d'expressió de MCP-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6 i CD68.

La principal funció de MCP-1 (Macrophage chemoattractant Protein 1) és atreure macròfags cap al lloc de la inflamació i activar-los (Celletti, 2001; Yamada, 2003). Aquesta molècula pro-inflamatòria pot ser produïda pels propis macròfags, que, així, mantenen i incrementen la resposta immune i, per les cèl·lules endotelials, les cèl·lules de la musculatura llisa i pels limfòcits. En canvi, les citocines pro-inflamatòries TNF- α , IL-1 β actuen sobre un espectre més ampli de cèl·lules, recluten i activen limfòcits, cèl·lules dendrítiques, etc. i actuen també sobre les pròpies cèl·lules del teixit inflammat on indueixen la producció d'òxid nítric o fins i tot, apoptosi (Mackay, 2001). La proteïna CD68 (o Mac-1) és una molècula de membrana específica de macròfags (Abbas, 2000) i, per tant, el nivell d'expressió en un teixit pot ser indicatiu de la quantitat de macròfags en aquest teixit. Es va realitzar una anàlisi de l'expressió

de tots aquests gens. L'expressió de tots ells mostrava una tendència a incrementar lleugerament, encara que en cap cas s'observà un increment estadísticament significatiu (Figura 40).

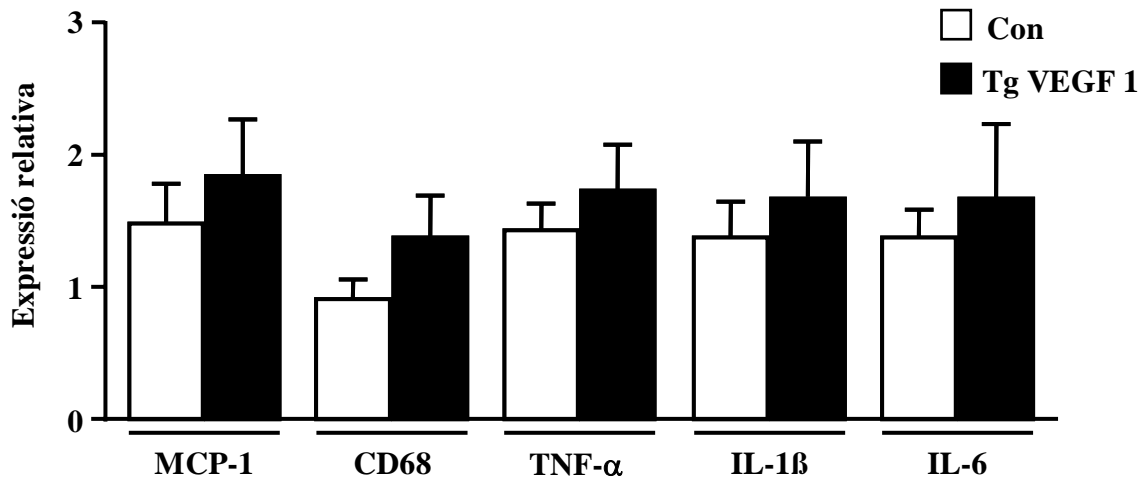


Figura 40. Anàlisi de l'expressió de diverses citoquines i marcadors d'inflamació en els pàncrees de ratolins controls i transgènics VEGF 1 a l'edat de 8 mesos. Mitjançant Q-PCR a partir d'extractes de RNA de pàncrees es va analitzar l'expressió de TNF- α , IL-1 β , MCP-1 i CD68. El resultat és la mitja \pm SEM de 4 animals per grup experimental, tal i com s'indica a l'apartat de Materials i Mètodes.

Encara que no es van detectar diferències significatives, no es podia descartar que hi hagués una resposta inflamatòria en els illots, ja que el RNA procedent del pàncrees exocrí podia diluir el RNA dels gens d'interès dificultant-ne la correcta mesura. Així doncs, caldria analitzar l'expressió de citoquines en extractes d'illots. No obstant, donat que els animals Tg VEGF 1 a l'edat de 8 mesos només presentaven cèl·lules β aïllades no se'n van poder obtenir illots. Per aquest motiu, es van aïllar illots d'animals de 5 mesos, ja que a aquesta edat els animals mantenien els illots i ja presentaven infiltració leucocitària (principalment de macròfags).

A partir dels extractes de RNA de pàncrees d'animals controls i transgènics de 5 mesos, es va mesurar el nivell d'expressió de MCP-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, CD68 i del receptor de MCP-1 (CCR2). En determinar l'expressió de MCP-1, es va observar que els illots transgènics expressaven 15 vegades més MCP-1 que els controls (Figura 41A). D'aquesta manera, VEGF activava la producció de MCP-1 a les cèl·lules endotelials dels illots i atreia als macròfags infiltrants (Figura 37). A més, s'ha detectat l'expressió de MCP-1 a les cèl·lules β d'illots en cultiu en resposta a IL-1 β i TNF- α i, en condicions d'hipòxia (Ehrnfelt, 2004; Scröppel, 2004).

El receptor de MCP-1 (CCR2) s'expressa en diferents leucòcits i, la seva expressió pot ser incrementada pel lligand MCP-1 (Murdoch, 2000). Així, vam mesurar l'expressió de CCR2 als illots i vam observar que els illots transgènics l'expressaven 20 vegades més (Figura 41B). També es va observar un important augment en l'expressió de TNF- α , de IL-1 β i de IL-6 en els illots dels ratolins Tg (Figura 41C, D i E). TNF- α i IL-1 β poden disminuir la viabilitat de les cèl·lules β i, fins i tot, induir-ne l'apoptosi. També, són potents agents quimioattractants de limfòcits T i macròfags (Murdoch, 2000, Mackay, 2001). A més, IL-6 és un factor quimiotàctic i activador de limfòcits B (Cambpell, 1994). Aquests resultats explicarien l'augment en el nombre de limfòcits B i T en els pàncrees transgènics detectats mitjançant la tècnica del FACS. Per altra banda, s'ha descrit que TNF- α i IL-1 β disminueixen la funcionalitat dels illots (Eizerik, 1994; Eizerik, 2001), de manera que l'increment d'aquestes citoquines en els illots transgènics concordaria amb l'alteració de la secreció d'insulina als 5 mesos.

Així doncs, els illots transgènics, presentaven un procés inflamatori que donava una disminució de la secreció d'insulina als 5 mesos i desembocava als 8 mesos en la pèrdua de la massa de cèl·lula β fins donar diabetis oberta.

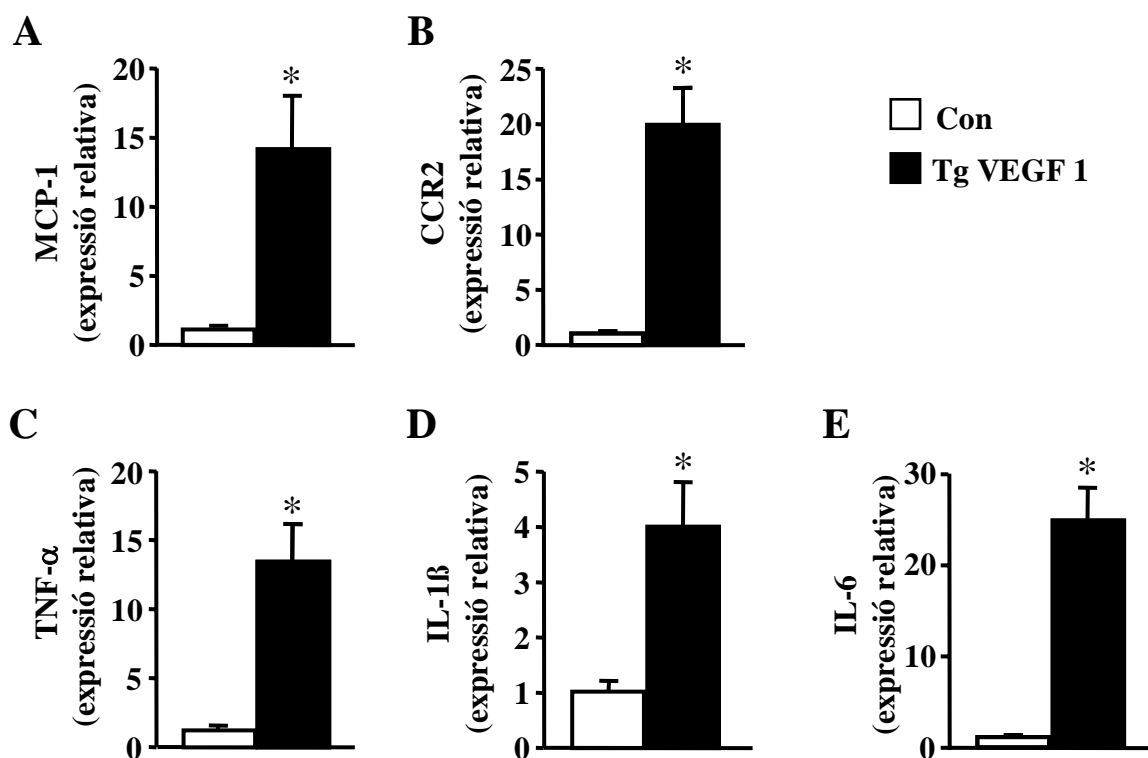


Figura 41. Anàlisi de l'expressió de diverses citoquines pro-inflamatòries. A partir d'extractes de RNA d'illots aïllats d'animals controls i transgènics VEGF 1 de 5 mesos d'edat, es va mesurar l'expressió, mitjançant PCR quantitativa, de (A) MCP-1, (B) CCR2, (C) TNF- α , (D) IL-1 β i (E) IL-6. El resultat és la mitja \pm SEM de cinc mostres per grup (*P<0.05).

6. EVOLUCIÓ DEL FENOTIP DELS ANIMALS Tg VEGF 2 AL LLARG DEL TEMPS.

6.1. Estudi de l'homeòstasi de la glucosa dels animals Tg VEGF 2.

La línia 2 dels ratolins transgènics RIP-I/VEGF a l'edat de 2 mesos presentava un metabolisme glucídic normal amb una secreció d'insulina i una resposta a una sobrecàrrega exògena de glucosa similar a la dels controls. A aquesta edat es va trobar alterada la morfologia dels illots, que apareixien desorganitzats i hipervascularitzats. Durant els següents mesos, fins a l'edat de 10 mesos, la glucèmia i la insulinèmia es van mantenir dins de la normalitat amb valors molt similars als dels controls del mateix sexe i edat (Figura 42A i B).

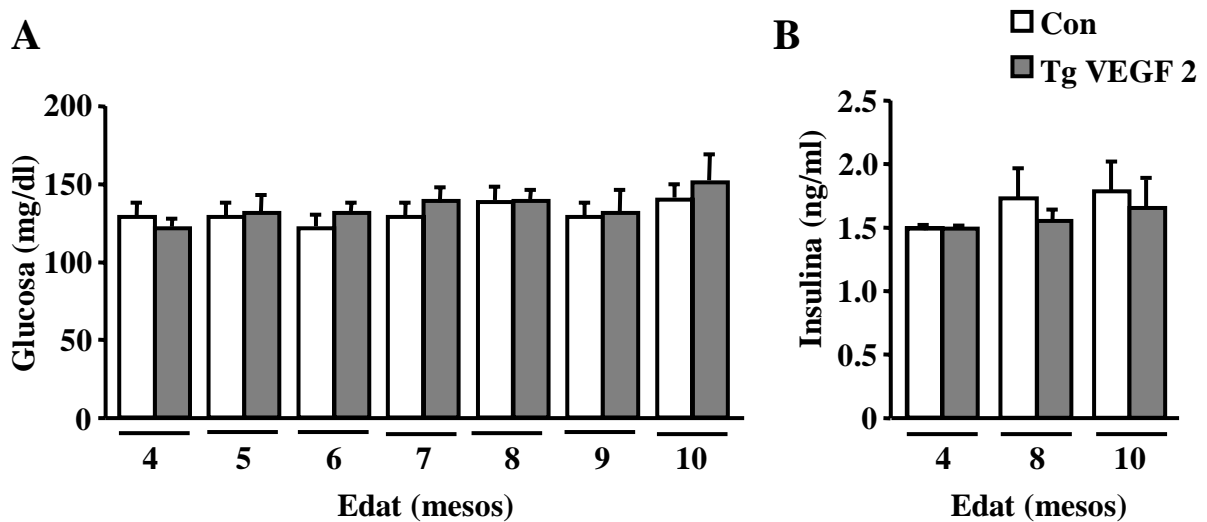


Figura 42. Estudi de l'homeòstasi de la glucosa en els animals VEGF 2 fins a l'edat de 10 mesos. A) **Determinació de la glucèmia.** Es va mesurar la concentració sèrica de glucosa en diferents moments de la seva vida. Les mesures es realitzaven a primera hora de matí i en estat d'alimentació, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. B) **Determinació de la insulinèmia.** Es va mesurar la concentració sèrica d'insulina en diferents moments de la seva vida. Les mesures es van realitzar a partir de mostres de sang obtingudes per la vena de la cua mitjançant ELISA, sempre a primera hora de matí i en estat d'alimentació, tal i com s'explica a Materials i Mètodes. Tant en la glucosa com en la insulina, els resultats són la mitja \pm SEM de 18 animals per grup.

A l'edat de 5 mesos, a diferència de la línia 1, la tolerància a la glucosa tampoc va ser diferent entre els animals controls i els transgènics VEGF 2. Després d'un dejuni de 16 hores es va realitzar un test intraperitoneal de tolerància a la glucosa (2 g/kg), en que es va mesurar la glucosa abans de la injecció i 15, 30, 60 i 90 minuts després de la sobrecàrrega. En cap determinació es van trobar diferències significatives entre transgènics i controls (Figura 43).

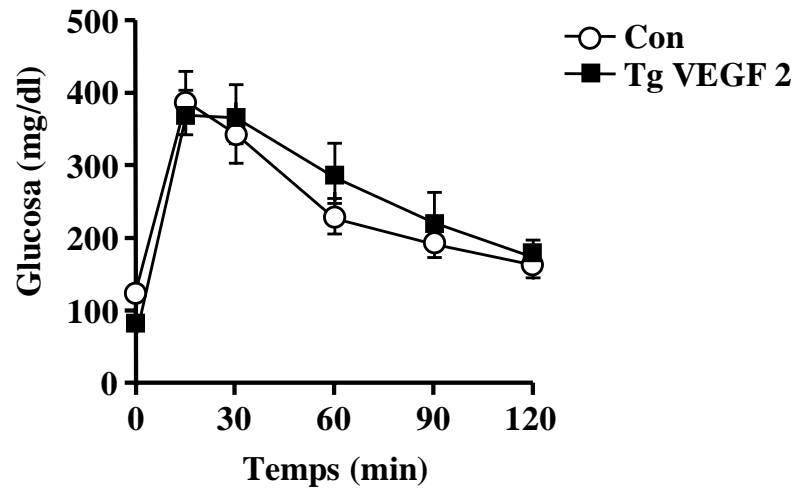


Figura 43. Estudi de l'homeòstasi de la glucosa en els animals VEGF 2 als 5 mesos. Test de tolerància a la glucosa. Es va dur a terme un test de tolerància a la glucosa injectant intraperitonealment glucosa (2 g/kg) després d'un dejuni de 16 hores. Es va mesurar la glucèmia als moments 0 (abans de la injecció de glucosa), 15 , 30 , 60 i 90 minuts després de la injecció, tal i com s'explica a Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja ± SEM de 8 animals per grup.

Els valors de glucosa circulant no variaven entre controls i Tg VEGF 2 fins a l'edat d'un any, en que es va observar una lleugera hiperglucèmia (179 mg/dl) respecte els animals controls (143 mg/dl) que era estadísticament significativa. Aquesta diferència, però, no es donava després d'un dejuni de 16 hores (Figura 44).

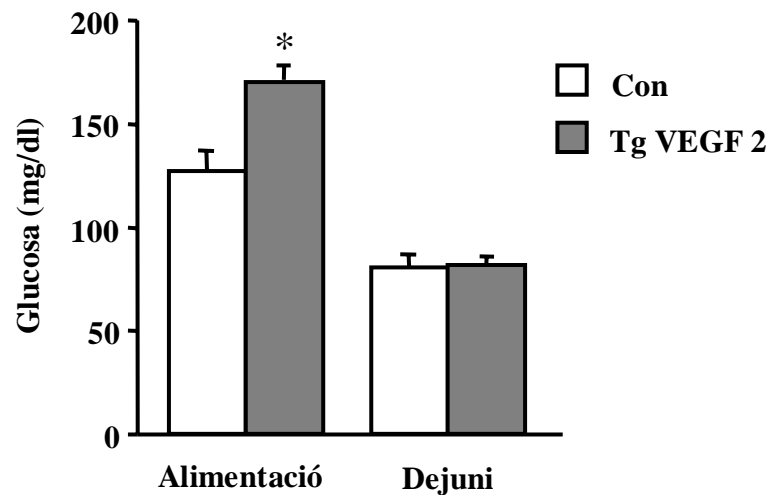


Figura 44. Determinació dels nivells sèrics de glucosa en animals Tg VEGF 2 d'un any. En animals controls i transgènics VEGF 2, es va mesurar la glucèmia en estat d'alimentació i després d'un dejuni de 16 hores, tal i com s'explica a l'apartat Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja± SEM de 14 animals per grup (*P<0,05).

També es va determinar la insulinèmia, tant en estat d'alimentació com de dejuni. Així, tal i com s'ha descrit a la literatura, es va observar que, els nivells d'insulina circulant en els animals controls incrementaven en animals vells, per compensar la creixent demanda d'insulina. Per contra, en estat d'alimentació, la insulinèmia era significativament inferior en els ratolins transgènics respecte els controls de la seva edat, de manera que aquesta deficiència en la insulinèmia podia explicar la hiperglucèmia en alimentació en aquests animals (Figura 45).

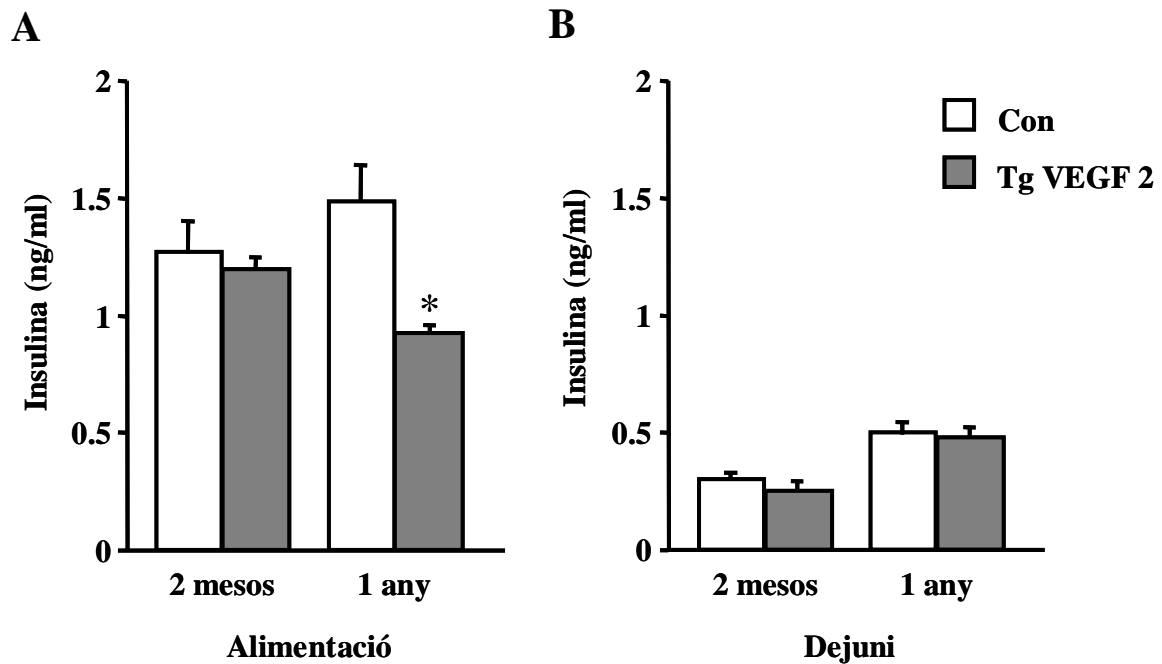


Figura 45. Determinació dels nivells sèrics d'insulina en animals VEGF 2 de dos mesos i d'un any. Es va mesurar la insulinèmia en estat d'alimentació i després d'un dejuni de 16 hores en animals de dos mesos i d'un any controls i transgènics de la línia 2, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja±SEM de 14 animals per grup (*P<0,05).

Donat que en els ratolins de la línia 2 d'un any d'edat es van observar una lleugera hiperglucèmia i hipoinsulinèmia, es va estudiar la capacitat de secreció d'insulina en resposta a una sobrecàrrega de glucosa a aquesta edat. Així, amb aquest objectiu, es va dur a terme un test de tolerància a aquest sucre en ratolins de 12 mesos d'edat. En paral·lel al seguiment de la glucèmia, es va analitzar la concentració d'insulina. Els animals transgènics de la línia 2 presentaven una marcada intolerància a la glucosa (Figura 46A), arribant a glucèmies significativament superiors durant tot el test. Aquesta intolerància es va correspondre amb una disminució en la secreció d'insulina en resposta al sucre (Figura 46B).

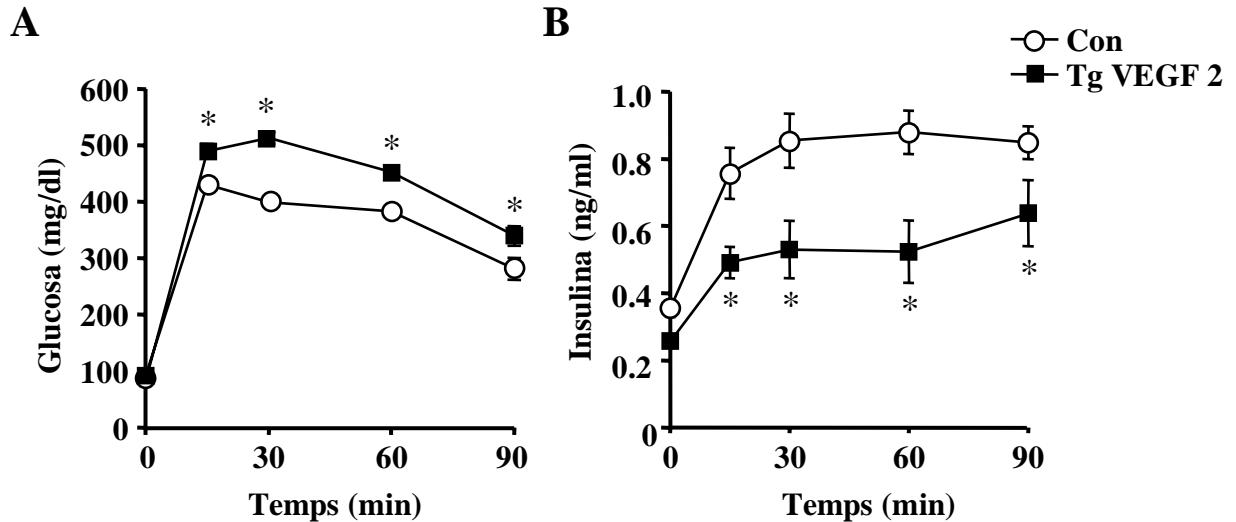


Figura 46. Estudi de la tolerància a la glucosa i la secreció d'insulina en ratolins de la línia 2 d'un any d'edat. **A) Test de tolerància a la glucosa (GTT).** Es va administrar glucosa (2 g/Kg pes) intraperitonealment després de 16 hores de dejuni. El seguiment de la glucèmia es va realitzar a minut 0, 15 i llavors cada 30 minuts. Els resultats són la mitja \pm SEM de 14 animals per grup (* ratolins VEGF 2 vs. controls en aquell mateix punt; *P<0.05). **(B) Secreció d'insulina durant el GTT.** Durant el GTT es van obtenir mostres de sang de cada animal en cadascun dels punts del test. A partir d'aquestes mostres es va mesurar per ELISA la concentració d'insulina. Els resultats són la mitja \pm SEM de 14 animals per grup (* ratolins VEGF 2 vs. controls en aquell mateix punt; *P<0.05).

6.2. Estudi morfològic dels illots en els animals Tg VEGF 2 d'un any d'edat.

En primer lloc, es va estudiar l'organització dels diferents tipus cel·lulars dins l'illot i l'estructura de la vascularització insular. Amb aquesta finalitat, es van realitzar dues dobles tincions immunohistoquímiques: per una banda, contra insulina i contra glucagó, per marcar les cèl·lules β i les α i, per l'altra, contra insulina i col·lagen IV, per marcar les cèl·lules β i la membrana basal dels vasos.

Els illots dels animals transgènics apareixien desestructurats amb cèl·lules α tant al centre com a la perifèria i amb un important increment en la quantitat de vasos, similarmet a com ho feien a l'edat de dos mesos (Figura 47).

Insulina / Glucagó

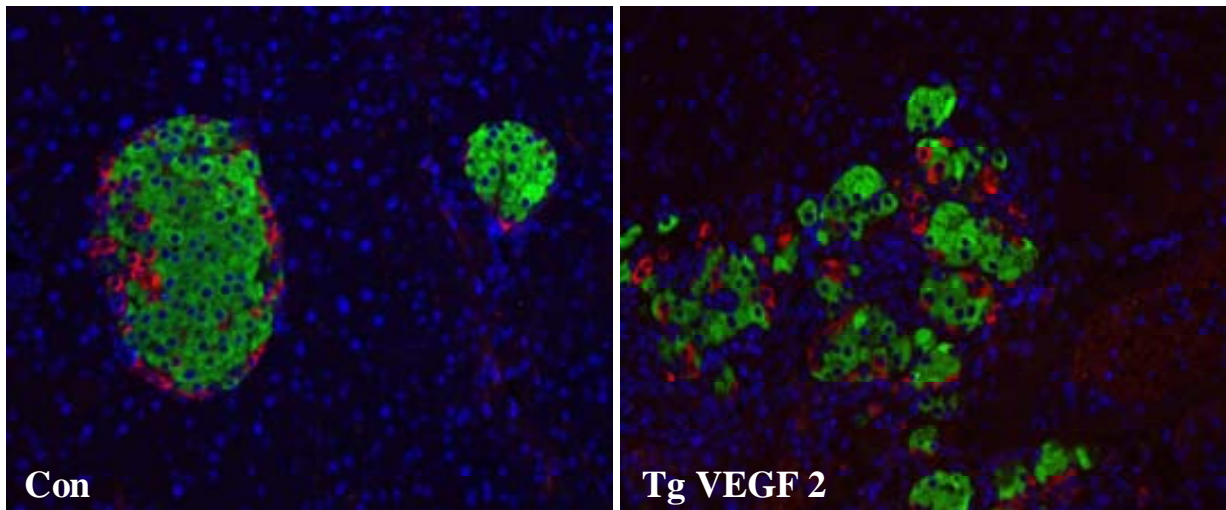


Figura 47. Estudi de la distribució de les cèl·lules endocrines als illots dels animals VEGF 2 vells. Es va realitzar un marcatge immunohistoquímic anti-insulina (verd) i anti-glucagó (vermell) en seccions de pàncrees d'animals controls i transgènics VEGF 2 d'un any d'edat, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Magnificació x200.

La vascularització dels illots Tg VEGF 2 d'un any d'edat estava augmentada respecte els controls de la mateixa edat, si bé, no semblava més important que als dos mesos (Figura 48). Així doncs, les alteracions en la morfologia i la microcirculació dels illots en els transgènics d'un any eren similars a les dels Tg VEGF 2 joves, de manera que no podrien explicar la disminució en la secreció d'insulina.

Insulina / Col·lagen IV

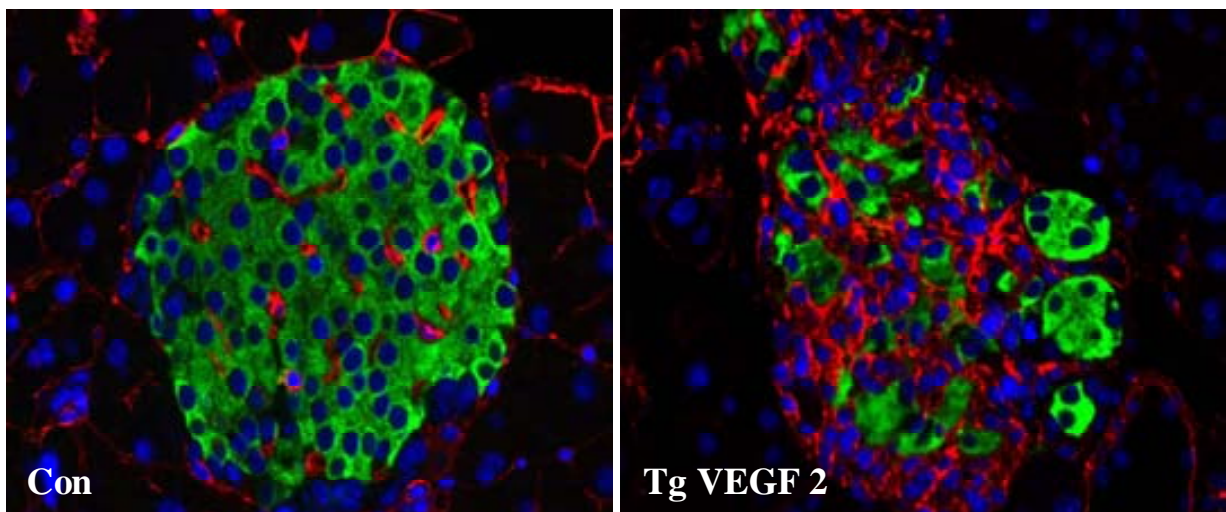


Figura 48. Estudi de la vascularització de l'illot dels animals VEGF 2 vells. Es va realitzar un marcatge immunohistoquímic anti-insulina (verd) i anti-col·lagen IV (vermell) en seccions de pàncrees d'animals controls i transgènics de la línia 2 d'un any d'edat, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Magnificació x400.

6.3. Determinació de la massa de cèl·lula β en els animals VEGF 2 d'un any.

Una disminució en la secreció d'insulina pot ser deguda a una disminució en la massa de cèl·lula β . A l'edat d'un any, els ratolins Tg VEGF 2 mostraven una disminució de la massa de cèl·lula β respecte els controls de la mateixa edat (Figura 49A). En comparar la massa de cèl·lula β en animals de 12 mesos amb el valor que es va obtenir en animals joves, es va observar que aquest paràmetre incrementava amb l'edat en els ratolins controls, mentre que es mantenia sense un canvi significatiu en els animals transgènics (Figura 49B). S'ha descrit que, amb l'edat, la massa de cèl·lula β incrementa per tal de compensar els majors requeriments d'insulina (Bonner-Weir, 2001). Aquest procés es va donar en els ratolins controls, però no en els transgènics.

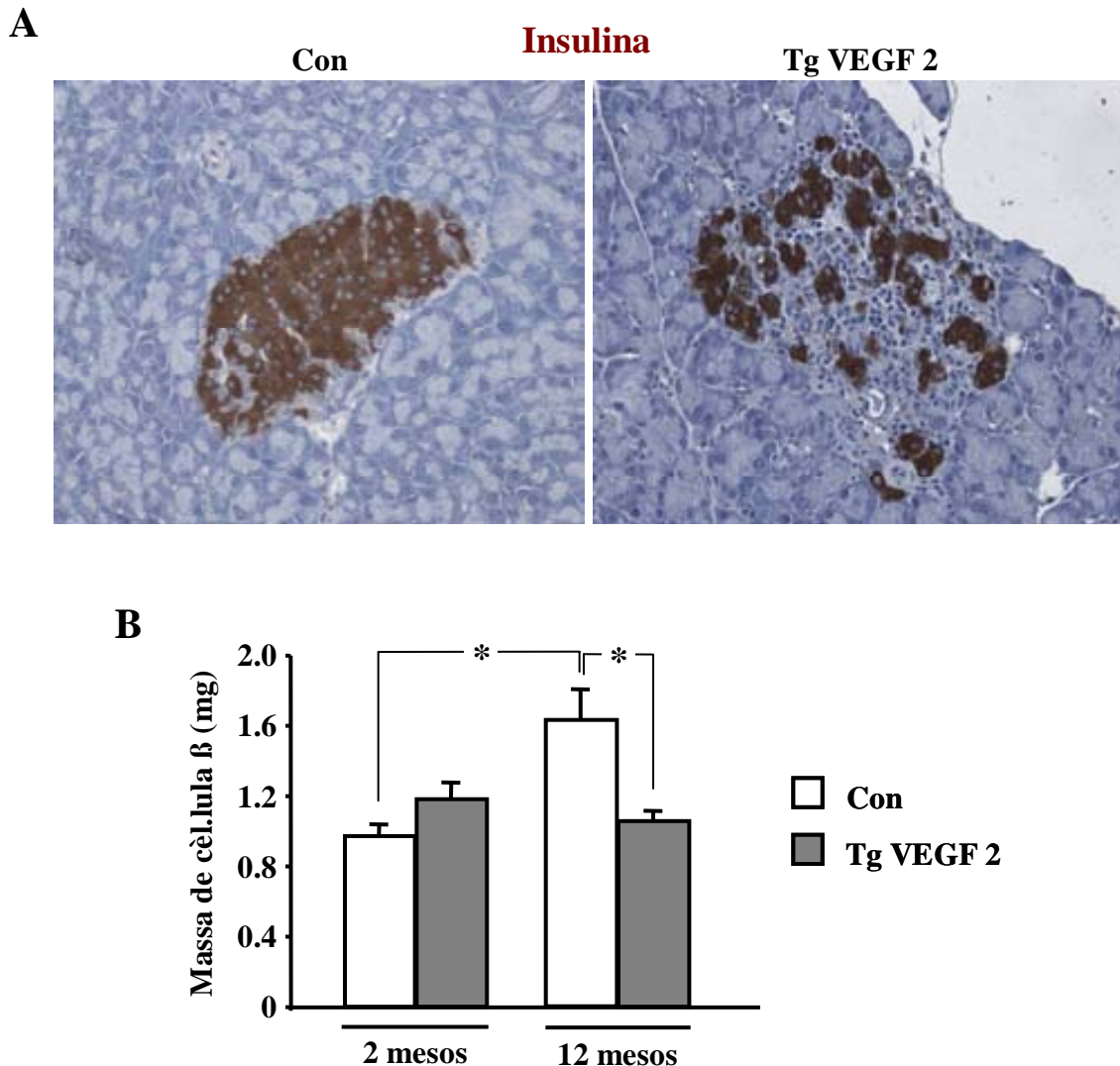


Figura 49. Anàlisi morfomètric del pàncreas endocrí dels animals VEGF 2 als 2 i 12 mesos. A) Anàlisi immunohistoquímic contra insulina. Les cèl·lules β es van marcar amb un anticòs anti-insulina, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Magnificació x200. **B) Determinació de la massa de la cèl·lula β .** Es va mesurar l'àrea de cèl·lula β respecte l'àrea de pàncreas en tres seccions per animal, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. El resultat és la mitja \pm SEM de 4 animals per grup (*P<0,05)

Els ratolins Tg VEGF 2 d'un any mostraven una disminució en la massa de cèl·lula β respecte els controls de la mateixa edat. Això podia ser degut a un increment en l'apoptosi i/o a una menor replicació de les cèl·lules β . Així, en primer lloc, es va quantificar la taxa d'apoptosi, utilitzant la tècnica del TUNEL combinada amb una tinció contra insulina. No es va trobar una diferència significativa entre grups (Figura 50A). A continuació, es va mesurar l'índex de replicació de les cèl·lules β mitjançant una tinció immunohistoquímica contra insulina i contra Ki67 (Figura 50B). Els illots dels animals Tg VEGF 2 d'un any d'edat van mostrar una taxa de replicació de les cèl·lules β significativament menor que els illots dels ratolins controls de la mateixa edat. Així, la massa de cèl·lula β en els ratolins transgènics no incrementava amb l'edat, probablement, degut a una disminució en la taxa de replicació de les cèl·lules β .

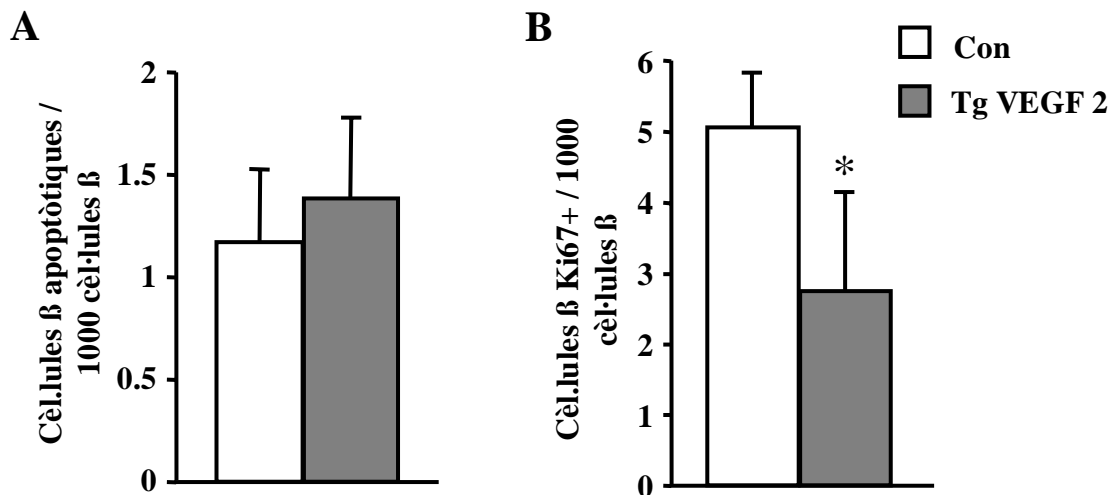


Figura 50. Anàlisi de l'índex d'apoptosi i de replicació de les cèl·lules β dels animals controls i transgènics VEGF 2 als 12 mesos d'edat. A) Quantificació de l'apoptosi de les cèl·lules β . El comptatge es va realitzar mitjançant la tinció de les cèl·lules β amb un anticòs anti-insulina i marcant el DNA de les cèl·lules apoptòtiques amb la tècnica del TUNEL. es van comptar més de 5000 cèl·lules β per animal en diferents seccions, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. El resultat és la mitja \pm SEM (* p <0.05). **B) Determinació de la taxa de replicació de les cèl·lules β .** Es va realitzar una doble tinció immunohistoquímica contra insulina i contra Ki67. El resultat és la mitja \pm SEM (* P <0.05).

6.4. Estudi de la inflamació del pàncrees dels animals VEGF 2 d'un any.

Els animals Tg VEGF 2 presentaven una alteració en la secreció d'insulina i en la tolerància a la glucosa a l'edat d'un any. Aquest efecte podia ser degut a la desorganització de l'illot o l'increment de col·lagen IV i d'endoteli, però aquests processos ja es donaven en animals joves de dos mesos, que no mostraven diferències en la capacitat de secreció respecte els controls. Per altra banda, en els pàncrees dels ratolins Tg VEGF 1 es va descriure un procés inflamatori que començava a l'edat de 5 mesos i coincidia amb les alteracions en l'homeòstasi de la glucosa. Per tant, les alteracions en la funció dels illots en els animals Tg VEGF 2 vells també podien relacionar-se amb l'activitat pro-inflamatòria de VEGF. Així, vam estudiar si en aquests animals també es donava un procés similar que pogués explicar la pèrdua de funcionalitat de l'illot i la disminució de la replicació de la cèl·lula β .

6.4.1. Caracterització dels leucòcits en el pàncrees dels animals VEGF 2 d'un any d'edat.

Es va determinar la presència de leucòcits al pàncrees d'animals controls i Tg VEGF 2 joves i vells mitjançant una doble tinció immunohistoquímica contra insulina i contra CD45 en talls histològics de pàncrees. No vam observar infiltració CD45⁺ en els illots dels animals controls, tant joves com d'un any d'edat, ni tampoc en els pàncrees dels ratolins Tg VEGF 2 de dos mesos. En canvi, en els illots dels ratolins transgènics de 12 mesos, s'hi van trobar cèl·lules marcades amb l'anticòs contra CD45 (Figura 51A). La quantitat d'aquestes cèl·lules variava molt entre illots i entre animals, però en tots els transgènics d'un any se n'hi van trobar i, a més, a gairebé tots els illots n'hi havia com a mínim una.

Per concretar si es tractava de macròfags, unes altres seccions histològiques es van incubar amb un anticòs contra insulina i un anticòs contra F4/80. Així, s'hi va poder comprovar la presència de macròfags, encara que no podíem afirmar que totes les cèl·lules CD45⁺ ho fossin. La resta d'animals, en no presentar cèl·lules marcades amb CD45, no van mostrar cèl·lules F4/80⁺ (Figura 51B).

Així doncs, els ratolins Tg VEGF 2, amb l'edat, desenvolupaven un procés inflamatori en el pàncrees, que era més lleu que als Tg VEGF 1. D'aquesta manera, la inflamació als Tg VEGF 2 vells disminuïa la secreció d'insulina desembocant en intolerància a la glucosa.

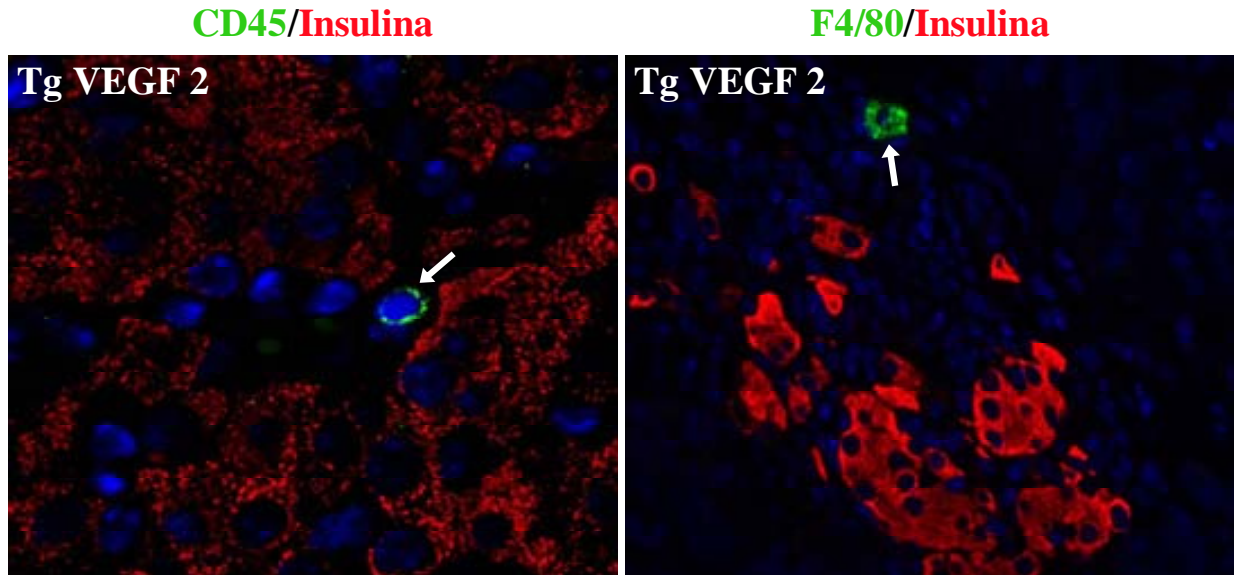


Figura 51. Anàlisi de la infiltració en els pàncrees dels animals Tg VEGF 2 d'un any d'edat. Amb l'objectiu de caracteritzar les cèl·lules infiltrants en els pàncrees dels animals Tg VEGF 2 de 12 mesos es van realitzar diferents tincions immunohistoquímiques en seccions de pàncrees transgènics, tal i com s'indica a l'apartat Materials i Mètodes. **A)** Tinció doble per insulina (vermell) i CD45 (verd) que és un marcador de leucòcits. **B)** Tinció doble per insulina (vermell) i F4/80 (verd) que és un marcador de macròfags. Es presenten diverses imatges de pàncrees de ratolins Tg VEGF 2 d'un any on hi havia cèl·lules positives per CD45 o F4/80. No es mostren illots controls ni transgènics de 2 mesos, ja que no s'hi va detectar cap cèl·lula positiva. Magnificació 400x.

6.4.2. Detecció de citokines inflamatòries en els illots dels animals VEGF 2 d'un any.

Una vegada demostrada la infiltració de macròfags al pàncrees dels animals Tg VEGF 2 d'un any, es va mesurar l'expressió de diverses citokines. Per fer-ho es van obtenir extractes de RNA a partir d'illots aïllats d'animals controls i TG VEGF 2 als 2 i als 12 mesos d'edat. Mitjançant PCR quantitativa es van determinar els nivells de RNA de les citokines TNF- α , IL-1 β i MCP-1.

Els illots d'animals Tg VEGF 2 d'un any expressaven gairebé 3 vegades més MCP-1 que els illots dels controls de la mateixa edat (Figura 52A). Al contrari, els illots dels animals de 2 mesos no presentaven diferències significatives entre ells. A més, mitjançant una anàlisi per Q-PCR, es va observar un important augment en l'expressió de TNF- α i IL-1 β en els illots dels ratolins transgènics vells (Figura 52B i C). Aquesta pujada en els nivells de RNA de TNF- α i IL-1 β no es va donar en els illots transgènics dels ratolins de dos mesos. Així doncs, aquest resultat suggeria que la producció d'aquests factors pro-inflamatoris era paral·lel a la presència de macròfags infiltrants en els illots (Murdoch, 2000; Mackay, 2001).

També es va mesurar l'expressió de IL-6, tant en illots d'animals joves com d'un any d'edat. En aquest cas, en els animals Tg VEGF 2 de dos mesos ja s'observava un increment de l'expressió d'IL-6, que es mantenia de forma similar en els illots dels animals d'un any (Figura 52D). Per tant, l'aparició d'aquesta citokina inflamatòria era molt anterior a la presència de leucòcits en el pàncrees dels animals Tg VEGF 2. S'ha descrit que VEGF indueix la producció d'IL-6 a les cèl·lules endotelials (Mackay, 2001), de manera que l'expressió que es detectava ja en animals joves (on no es van observar cèl·lules infiltrants) suggeria que IL-6 era secretada per l'endoteli vascular dels illots en resposta a la sobreexpressió de VEGF i no per leucòcits.

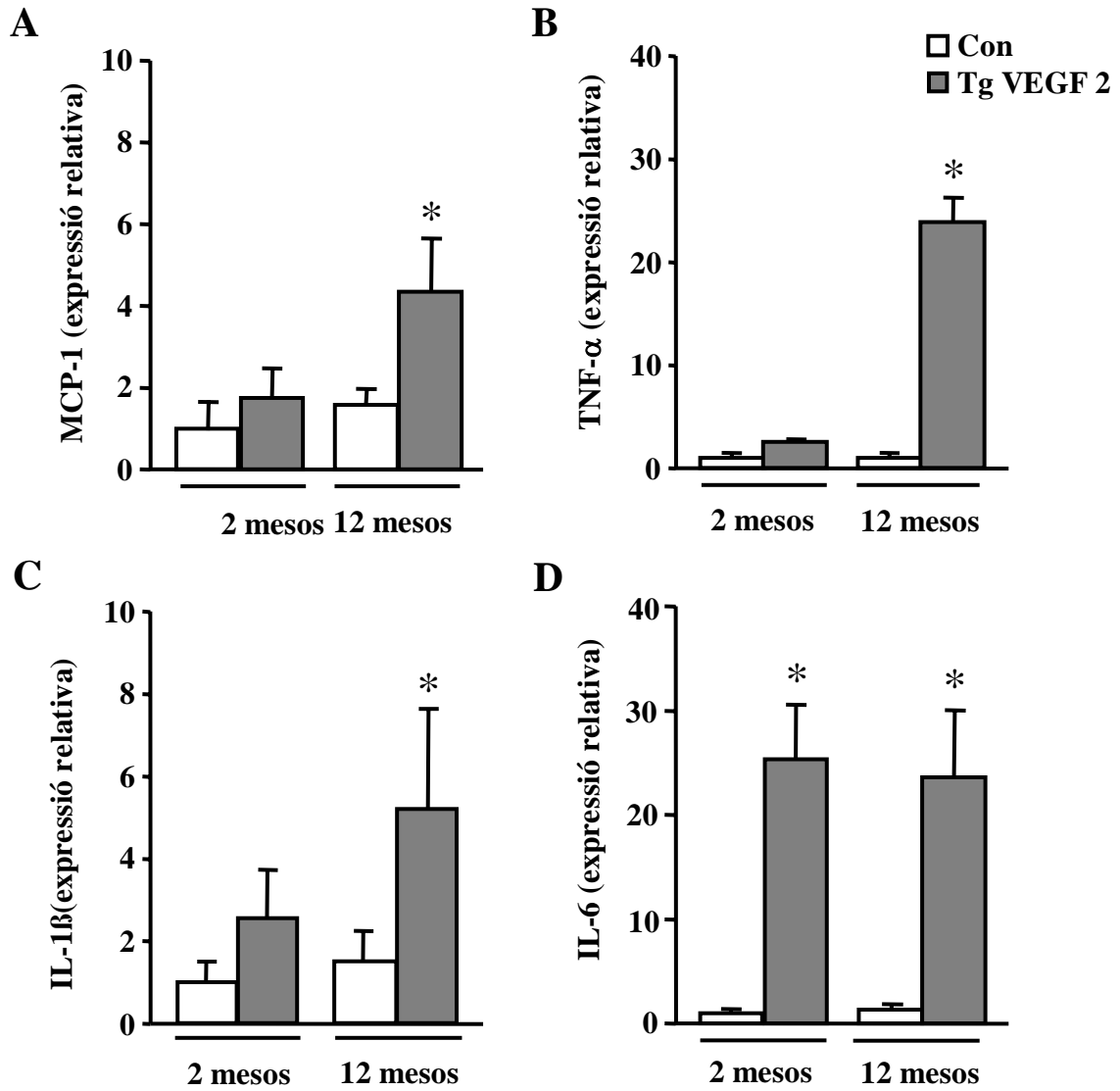


Figura 52. Anàlisi de l'expressió de diverses citoquines pro-inflamatòries. A partir d'extractes de RNA d'illots aïllats d'animals controls i transgènics de la línia 2 de 2 i de 11-12 mesos d'edat es va mesurar l'expressió de (A) MCP-1, (B) TNF- α (C) IL-1 β i (D) IL-6 mitjançant PCR quantitativa. El resultat és la mitja \pm SEM de quatre mostres per grup i cada mostra procedeix de tres animals (* $P < 0.05$ de transgènics vs controls a cada edat).

6.5. Estudi dels gens implicats en la funció dels illots en animals VEGF 2 vells.

A continuació, per tal de determinar quines podien ser les alteracions responsables de la disminució en la secreció d'insulina en els animals Tg VEGF 2 vells, vam analitzar l'expressió de gens claus en el procés de secreció de la insulina.

El sensor de la glucosa de la cèl·lula β està constituït pel transportador de membrana GLUT-2 i l'enzim glucoquinasa. La proteïna transmembrana GLUT-2 permet l'entrada de la glucosa dins la cèl·lula β i, a continuació, la glucoquinasa (GK) fosforila aquesta glucosa a glucosa-6-fosfat perquè entri en glucòlisi i es pugui metabolitzar (Bell, 2001).

Així doncs, en primer lloc, es va analitzar l'expressió del transportador de glucosa GLUT-2 en illots mitjançant PCR quantitativa. En els illots d'animals Tg VEGF 2 vells s'observà una disminució del 76% en l'expressió de GLUT-2 respecte els illots de ratolins control de la mateixa edat (Figura 53A). No es van trobar diferències significatives entre controls i transgènics en l'expressió de GLUT-2 en els illots d'animals joves.

Aquesta disminució es va confirmar posteriorment mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica de GLUT-2 combinada amb una tinció contra insulina en els pàncrees d'animals VEGF 2 vells (Figura 53B). El marcatge de GLUT-2 era menys intens en els illots dels animals transgènics d'un any. Es va observar que en els illots dels animals Tg VEGF 2 vells, un major nombre de cèl·lules β no mostraven GLUT-2 respecte en els controls, ja que quedaven separades de la resta de cèl·lules β per la desorganització de l'illot.

A continuació es va determinar l'expressió de la glucoquinasa mitjançant també la tècnica de la PCR quantitativa, tant en animals Tg VEGF 2 joves com vells. Els illots dels ratolins Tg VEGF 2 de 12 mesos van mostrar una disminució en els nivells de RNA de GK que va ser superior al 50% (que seria difícilment explicable només per un menor percentatge de cèl·lules β per illot). Així, l'expressió de GK disminuïa a les cèl·lules β dels animals Tg VEGF 2 vells (Figura 53C).

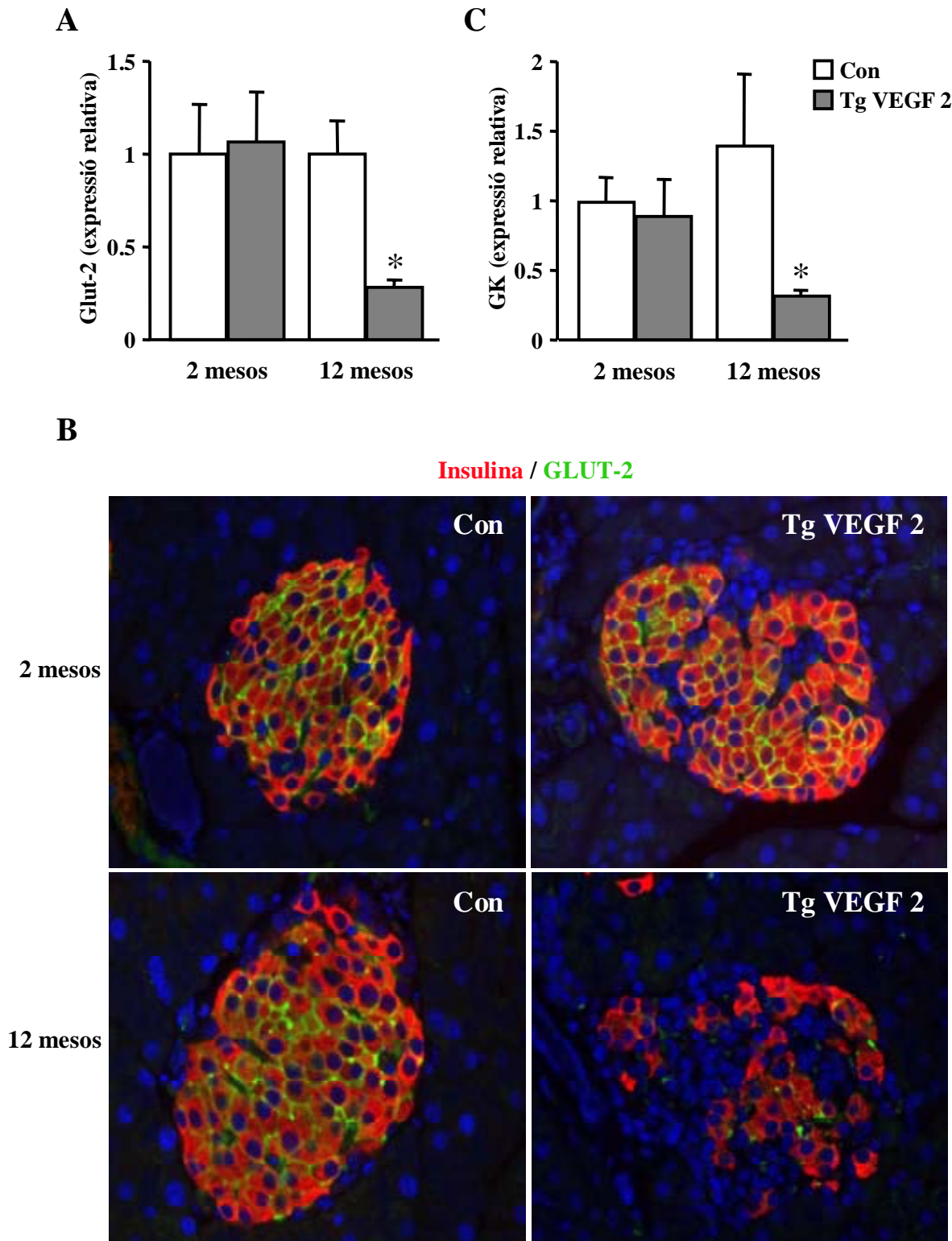


Figura 53. Anàlisi de l'expressió de les proteïnes implicades en la captació de glucosa en les cèl·lules β . **A) Determinació dels nivells de RNA de GLUT-2.** Es van determinar els nivells de mRNA de GLUT-2 mitjançant PCR quantitativa a partir d'extractes d'illots de ratolins controls i Tg VEGF 2 de dos mesos i 1 any d'edat, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja \pm SEM de 4 experiments independents pels animals joves i de 5 pels vells (* P <0.05). **B) Anàlisi immunohistoquímica per GLUT-2.** Es van fer talls histològics de pàncrees de ratolins controls i Tg VEGF 2 de 2 i 12 mesos d'edat. Es van incubar amb un anticòs anti-GLUT-2 (verd) i, un altre anti-insulina (vermell). Ampliació x400. **C) Determinació dels nivells de RNA de glucoquinasa.** Es van determinar els nivells de mRNA de glucoquinasa mitjançant PCR quantitativa a partir d'extractes d'illots de ratolins controls i Tg VEGF 2 de dos mesos i 1 any d'edat, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja \pm SEM de 4 experiments independents pels animals joves i de 5 pels vells (* P <0.05).

Així doncs, una menor expressió de GLUT-2 i de GK en els ratolins transgènics VEGF de la línia 2 d'un any disminuiria la captació de glucosa per part de les cèl·lules β i així, podria donar lloc a l'alteració en la capacitat de secreció d'insulina. (Terauchi, 1995; Grupe, 1995; Ling, Z, 2000)

El Pdx-1 és un dels principals factors de transcripció de la cèl·lula β i regula l'expressió dels gens implicats en la seva funció. Així, s'ha descrit que activa la transcripció del gen del transportador de glucosa GLUT-2 (Waeber, 1996) i el de la glucoquinasa (Watada, 1996b). A més, les citocines pro-inflamatòries com TNF- α i IL-1 β disminueixen l'expressió de Pdx-1 i alteren la secreció d'insulina (Eizerik, 1994; Eizerik, 2001).

Així doncs, amb l'objectiu de comprovar si una disminució de Pdx-1 podia ser la responsable de la disminució en GLUT-2 i GK (Babu, 2007), es va comparar la seva expressió en illots controls i transgènics mitjançant l'anàlisi per Q-PCR (Figura 54A). Així, es va trobar una disminució estadísticament significativa en els nivells de RNA de Pdx-1 en els illots dels ratolins Tg VEGF 2 vells. Per tant, la menor expressió de GLUT-2 i GK es podia explicar per una disminució de Pdx1. No obstant, cal considerar que la regulació de l'activitat de Pdx-1 és principalment per fosforilació i translocació a dins i fora del nucli (Elrick, 2001; Babu, 2007).

L'expressió de Pdx-1 és induïda principalment pel factor de transcripció HNF-3 β o Foxa2 (Ben-Shushan, 2001; Lee, 2002; Samara, 2002). En mesurar l'expressió d'aquest gen, es va trobar una disminució als illots dels animals Tg VEGF 2 vells. Els illots dels animals Tg VEGF 2 de dos mesos semblaven presentar una disminució, però, aquesta no era estadísticament significativa. No obstant, potser això indicava que la baixada en l'expressió de HNF-3 β començava ja en ratolins joves i, gradualment anava fent-se més important, fins mostrar diferències significatives i induïa la resta d'alteracions, fins arribar a intolerància a la glucosa a l'edat d'un any (Sund, 2001; Wilson, 2003; Servitja, 2004; Cerf, 2005) (Figura 54B).

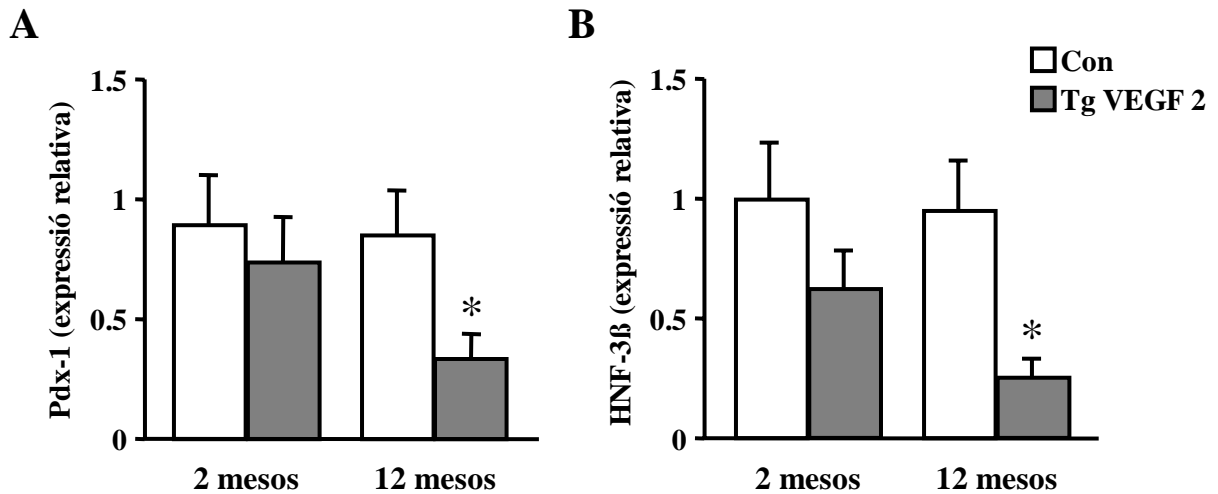


Figura 54. Expressió dels factors de transcripció Pdx-1 i HNF-3β. **A) Expressió de Pdx-1.** Els nivells d'expressió de Pdx-1 es van determinar per PCR quantitativa a partir d'extractes de RNA d'illots d'animals VEGF 2 de dos mesos i un any d'edat, tal i com s'indica a l'apartat de Materials i Mètodes. **B) Expressió d'HNF-3β.** Es va determinar l'expressió de HNF-3β mitjançant PCR quantitativa en els mateixos extractes. La quantitat de RNA es va normalitzar mitjançant l'expressió de RBS. Els resultats són la mitja±SEM de 4 experiments independents pels animals de 2 mesos i de 5 pels animals d'un any (*P<0.05).

7. ESTUDI DE LA SUSCEPTIBILITAT DELS ANIMALS Tg VEGF 2 AL TRACTAMENT AMB STZ.

Els ratolins Tg VEGF 2, a diferència dels Tg VEGF 1, no van esdevenir diabètics en cap moment al llarg de la seva vida. No obstant, la sobreexpressió de VEGF, que s'ha demostrat que és un factor pro-inflamatori, podria incrementar la susceptibilitat dels Tg VEGF 2 a desenvolupar diabetis enfront d'un factor accelerador. A més, la desorganització del pàncrees endocrí i un increment en la quantitat de col·lagen dins de l'illot s'ha relacionat amb l'aparició de diabetis oberta en models animals de diabetis tipus 2, com les rates GK (Homo-Delarche, 2006). Així doncs, vam analitzar la susceptibilitat d'aquests animals al tractament amb dosis molt baixes de STZ (tractament que es coneix com a *Multiple very low dosis of STZ, MVLD STZ*). S'ha descrit que, en ratolins control, el tractament amb dosis molt baixes de STZ (5 x 20 mg/Kg) no resulta diabetogènic, de manera que ratolins controls tractats amb aquesta dosi mantenen la normogluccèmia i no desenvolupen diabetis (Casellas, 2006).

7.1. Determinació de la glucèmia i la insulinèmia després del tractament.

Així, animals VEGF de 2 mesos van ser tractats amb 5 x 20 mg/kg de STZ. La glucèmia d'aquests animals es va mesurar en diferents dies durant quatre mesos i es feia sempre en estat d'alimentació i a primera hora del matí. Es va obtenir una primera mesura el dia 0, dia previ a la primera injecció del tractament amb STZ, per tal de tenir un valor de referència de la glucèmia dels mateixos animals.

Tant els animals control com els transgènics es mantien normogluccèmics al principi de l'estudi. No obstant, després d'un mes del tractament, els animals transgènics mostraven una glucèmia lleugerament superior, encara que les diferències no van ser significatives estadísticament a tot els punts (Figura 55A).

Per contra, la insulinèmia dels animals transgènics tractats al final de l'experiment no mostrava diferències significatives respecte els controls tractats (Figura 55B).

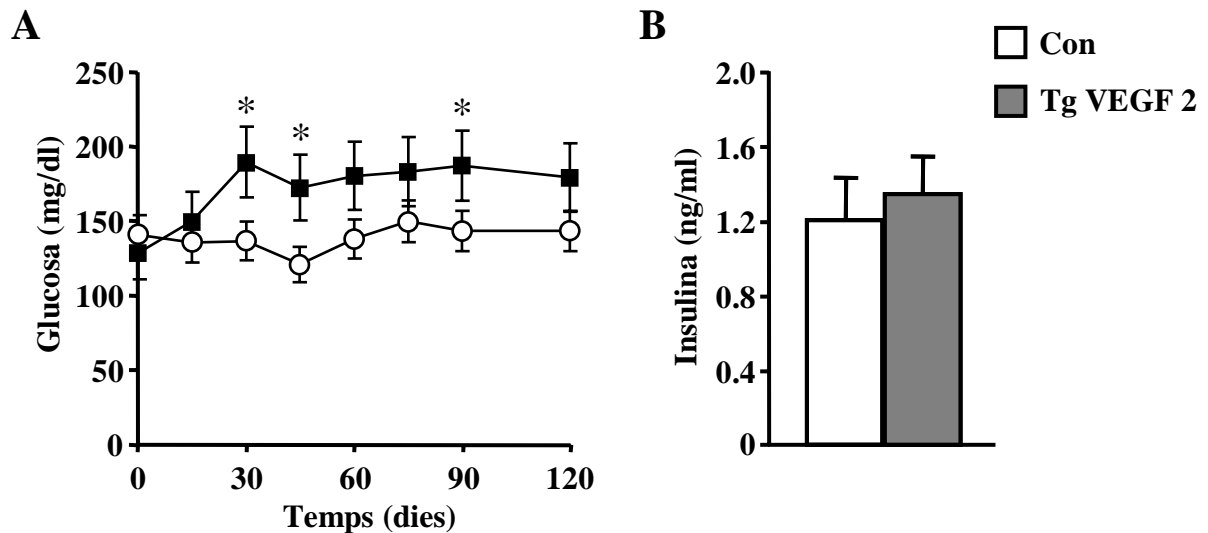


Figura 55. A) Seguiment de la glucèmia en els animals Tg VEGF 2 tractats amb 5 x 20mg/kg de STZ. Els nivells de glucosa en sèrum es van mesurar en els ratolins control (cercles blancs) i en els Tg VEGF 2 (quadrats negres) en alimentació després del tractament durant tres mesos, en diferents dies. La gràfica representa la mitja ± SEM de 8 animals per grup (*P<0.05). **B) Determinació de la insulinèmia al final de l'experiment.** Es va mesurar la insulina circulant a partir del sèrum en estat d'alimentació, tal i com s'explica a l'apartat Materials i Mètodes. El resultat és la mitja de 8 animals per grup en els animals tractats (*P<0,05).

7.2. Determinació de la tolerància a la glucosa i la secreció d'insulina *in vivo*.

Dos mesos després del tractament (quan van començar les diferències en la glucèmia entre animals controls i transgènics tractats), es va analitzar la tolerància dels animals a la glucosa i, en paral·lel, la secreció d'insulina *in vivo*. A partir del minut 15 després de la injecció del sucre, i durant tot el test, la glucèmia dels ratolins transgènics tractats amb STZ va ser significativament superior a la dels controls (Figura 56A). Aquesta intolerància a la glucosa dels ratolins transgènics tractats va anar acompanyada d'uns valors significativament inferiors en la insulina sèrica circulant durant el test (Figura 56B).

Als 5 mesos d'edat, els ratolins Tg VEGF 2 no mostraven diferències respecte els controls en la capacitat d'eliminar la glucosa sèrica després d'una sobrecàrrega i, per tant, el tractament amb 5 x 20 mg/kg de STZ accelerava el desenvolupament de la disfunció dels illots transgènics disminuint la seva capacitat de secreció d'insulina i induint intolerància a la glucosa. Així doncs, el tractament amb 5 x 20 mg/kg de STZ no portava a diabetis oberta, però sí a una intolerància a la glucosa, característica pròpia d'un estat pre-diabètic.

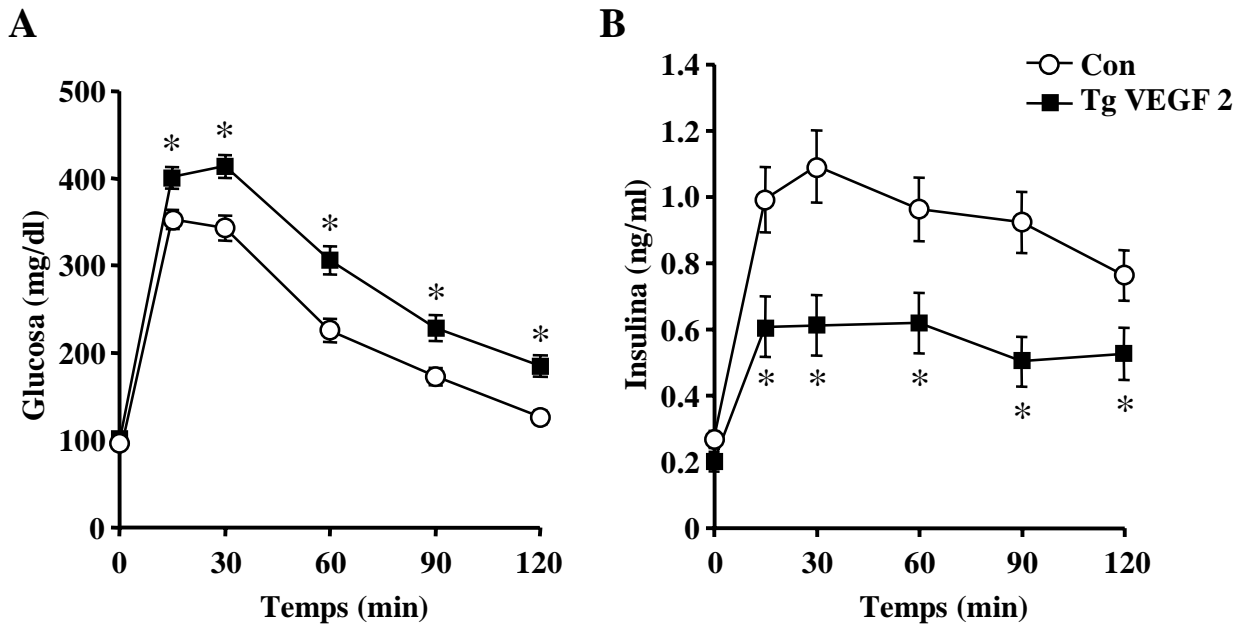


Figura 56. A) Test de tolerància a la glucosa. Es va realitzar una sobrecàrrega de glucosa de 2 g/kg mitjançant injecció intraperitoneal, en animals controls i Tg VEGF 2, dos mesos després del tractament amb STZ, i es va mesurar la glucèmia a temps 0, 15, 30, 60 i 90 minuts després de la injecció. Es representa el resultat de 8 animals per grup i el valor és la mitja \pm SEM dels animals avaluats (* $P < 0.05$). **B) Secreció d'insulina *in vivo*.** Durant el test de tolerància a la glucosa, en paral·lel, s'obtenia sang de la cua per mesurar posteriorment la insulinèmia. Són, també, 8 animals per grup i es representa la mitja \pm SEM dels animals avaluats (* $P < 0.05$).

7.3. Determinació de la massa de cèl·lula β i anàlisi morfològic del pàncrees endocrí dels animals VEGF 2 tractats amb STZ.

Al final de l'experiment, quatre mesos després del tractament, es va realitzar un estudi morfològic del pàncrees per tal de comprovar si la disminució en la secreció d'insulina observada era deguda a una pèrdua de massa de cèl·lules β i/o a altres alteracions del pàncrees endocrí. Primerament, es va determinar la massa de cèl·lula β tres mesos després del tractament. No es van observar diferències significatives entre ratolins controls i transgènics després del tractament amb STZ, ni tampoc respecte la massa dels animals controls i Tg VEGF 2 de dos mesos sense tractar (Figura 57A i B).

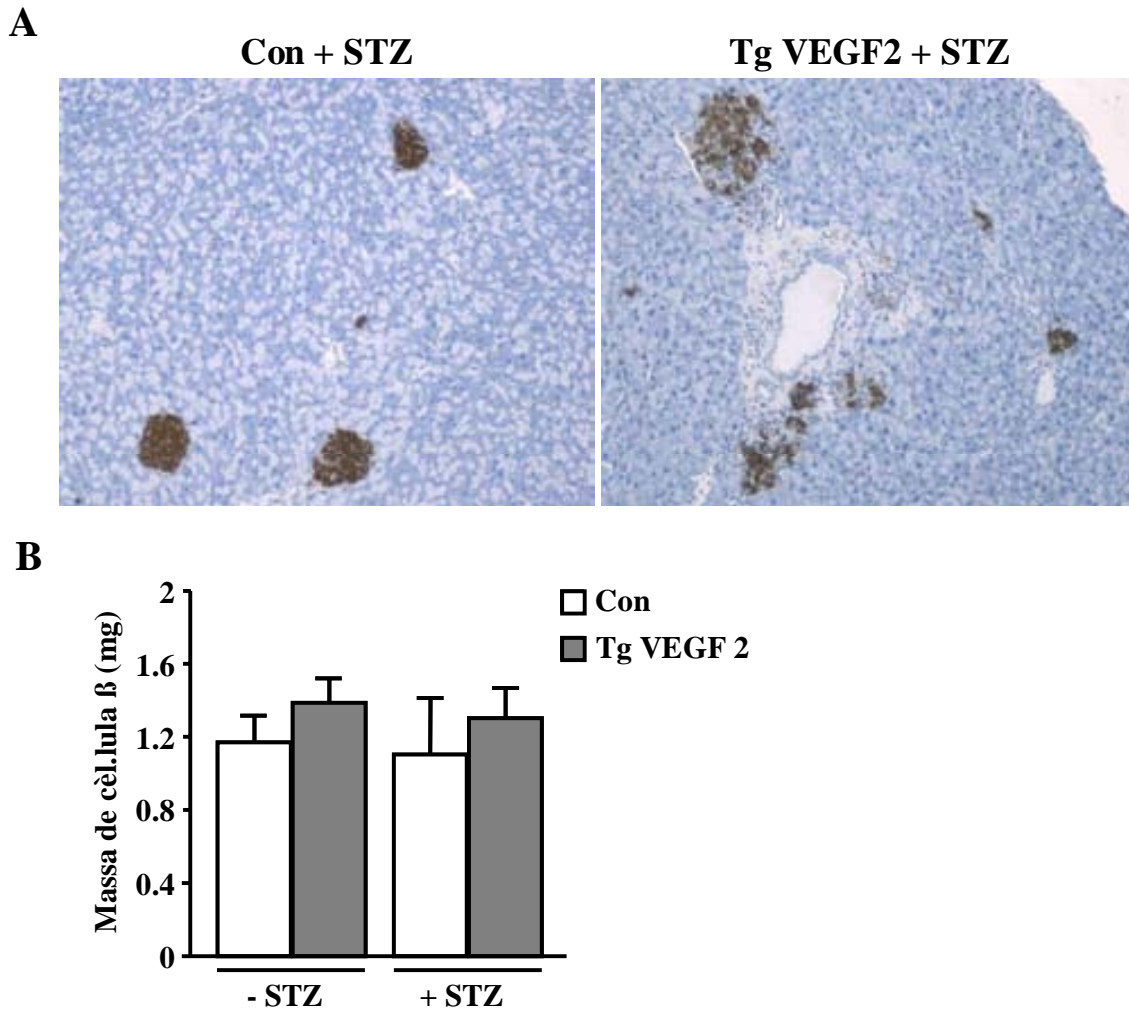


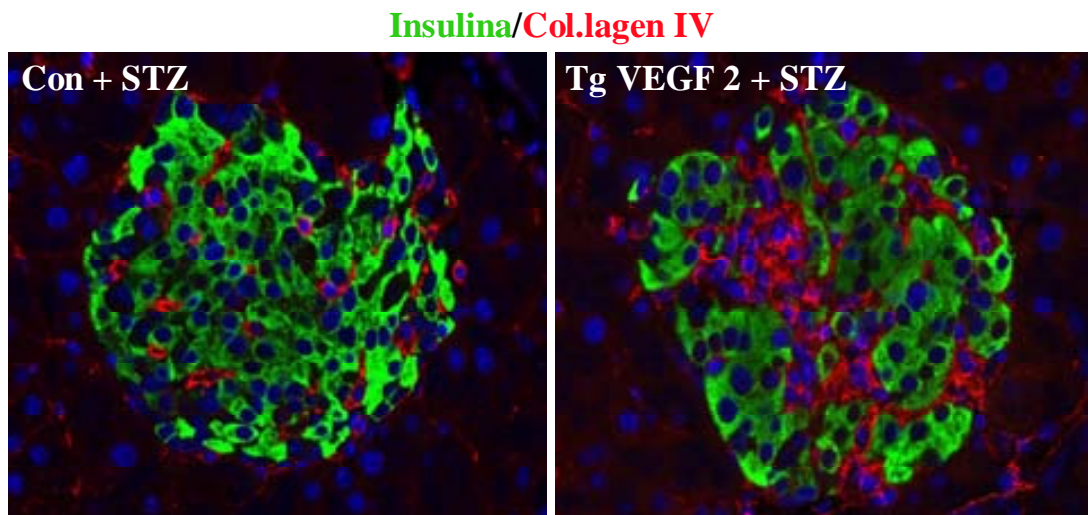
Figura 57. Anàlisi histològica dels pàncrees dels ratolins VEGF 2 després del tractament *MVLD* STZ (5 x 20 mg/kg). **A)** Tinció immunohistoquímica contra insulina. Es va detectar l'expressió d'insulina en els illots pancreàtics de ratolins controls i transgènics VEGF 2, quatre mesos després del tractament amb STZ, tal i com s'indica en l'apartat de Materials i Mètodes. Ampliació x200. **B)** Determinació de la massa de cèl·lula β . A partir del comptatge de l'àrea de cèl·lula β i l'àrea de pàncrees, es va obtenir la mesura de la massa de cèl·lula β , tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja \pm SEM de 4 animals per grup.

Els animals transgènics després del tractament continuaven mostrant un increment en el nivell de vascularització i en la quantitat de membrana basal igual que els ratolins transgènics no tractats, tal i com es va comprovar amb una doble tinció contra insulina i col·lagen IV (Figura 58A). S'ha descrit que la matriu extracel·lular dels capil·lars adjacents a les cèl·lules β té un efecte positiu sobre l'expressió d'insulina (Nikolova, 2006). No obstant això, l'increment de membrana basal i col·lagen IV en els illots dels animals Tg VEGF 2 no millorava la funcionalitat de l'illot, sinó, al contrari, els ratolins transgènics eren intolerants a la glucosa mentre que els controls, no ho eren.

En els animals Tg VEGF 1 i 2 es donava un procés inflamatori en el pàncrees que empitjorava amb el nivell d'expressió i l'edat. Encara que s'ha descrit que la soca C57Bl6: SJL és

menys susceptible a desenvolupar insulinitis després d'un tractament amb STZ, aquest tractament juntament amb VEGF era un factor inductor d'inflamació en aquests transgènics. Així, per estudiar si tenia lloc un procés inflamatori en els pàncrees dels animals Tg VEGF 2 joves tractats, es va realitzar una doble tinció immunohistoquímica contra F4/80 i contra insulina. En els illots dels ratolins controls tractats i dels transgènics no tractats no s'hi va trobar cap cèl·lula positiva pel marcatge de F4/80. En canvi, en els pàncrees dels ratolins transgènics tractats, una quarta part dels illots presentaven una o dos cèl·lules F4/80⁺ (Figura 58B). Aquest resultat indicava que en aquests illots hi havia inflamació i, la presència dels macròfags en podia ser causa o conseqüència. Per tant, la injecció de 5 x 20 mg/kg de STZ accelerava i avançava el procés inflamatori que es va descriure en els animals Tg VEGF 2 d'un any d'edat.

A



B

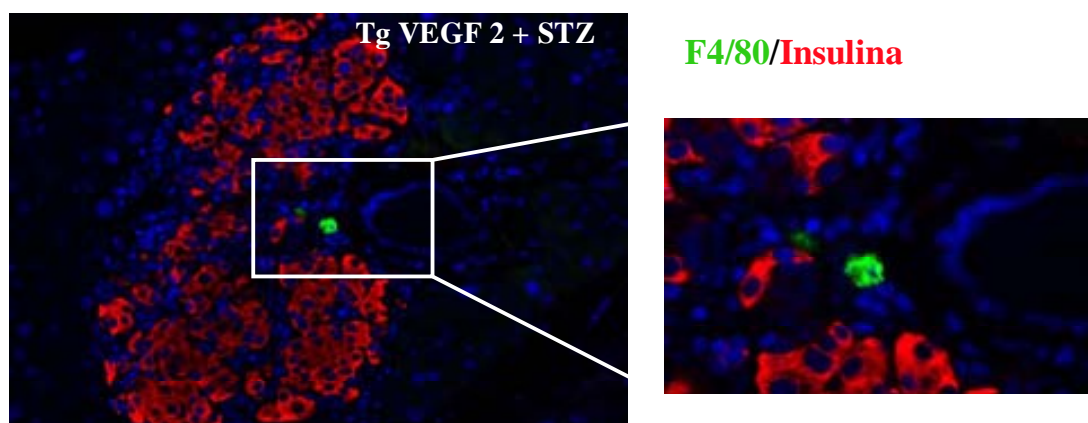


Figura 58. Estudi morfològic dels illots transgènics després del tractament 5 x 20 mg/kg STZ. A) Anàlisi immunohistoquímica per insulina i col·lagen IV. Es va analitzar la vascularització dels illots, marcats amb insulina (verd), mitjançant l'expressió de col·lagen IV (vermell). Es va fer en dos talls histològics de tres animals per grup, tal i com s'indica en l'apartat de Materials i Mètodes. Ampliació x200. **B) Anàlisi immunohistoquímica per macròfags.** Es va realitzar una doble tinció contra un marcador de macròfags, la proteïna F4/80 (verd), i insulina (vermell) en dues seccions de tres animals per grup, tal i com s'explica a l'apartat Materials i Mètodes. Magnificació x200 i x400.

En els animals Tg VEGF 2 d'un any d'edat es va relacionar l'alteració en la secreció d'insulina amb una disminució de l'expressió de GLUT-2. Així doncs, en els animals tractats amb 5 x 20 mg/kg de STZ i en els no tractats de la mateixa edat es va realitzar una anàlisi immunohistoquímica per GLUT-2 i per insulina. Vam observar, llavors, que els illots dels ratolins controls tractats no semblaven mostrar diferències en els nivells de GLUT-2 respecte els controls no tractats. Tampoc semblava que hi hagués una disminució en el marcatge de GLUT-2 en els transgènics no tractats. En canvi, després del tractament, els illots transgènics presentaven nombroses cèl·lules β (positives per insulina) sense GLUT-2 a la membrana (Figura 59A i B). Per tant, aquest resultat podria indicar que el procés inflamatori induïa una disminució en l'expressió de GLUT-2 a la membrana de les cèl·lules β i, com a conseqüència, una alteració en la secreció d'insulina (Eizerik, 1994; Eizerik, 2001).

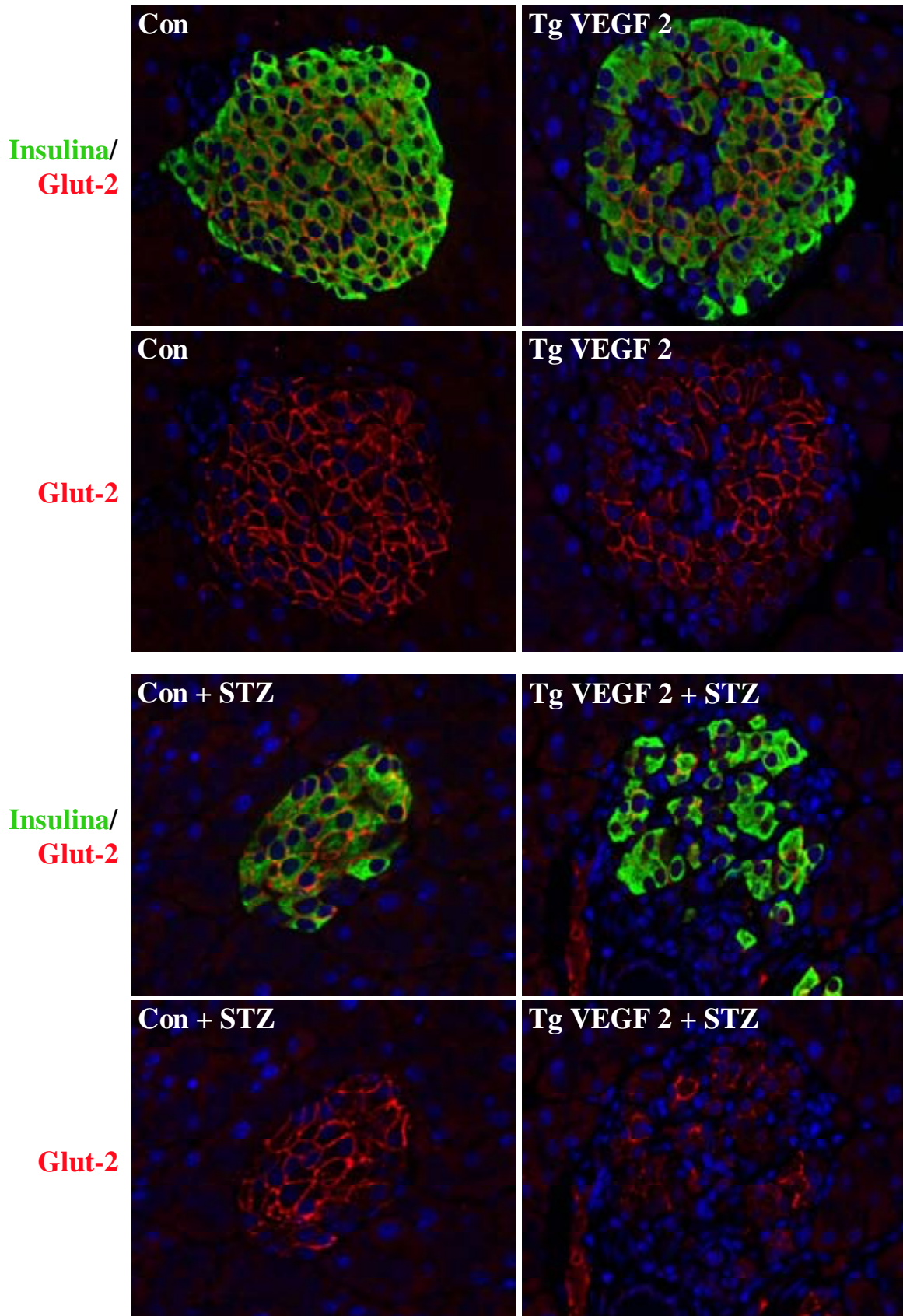


Figura 59. Anàlisi immunohistoquímica per GLUT-2. Es va realitzar una doble tinció contra GLUT-2 (en vermell) i insulina (en verd) en dos talls de dos animals per grup (controls i transgènics de la línia 2 sense tractar i tractats amb 20 mg/kg de STZ), tal i com s'indica Materials i Mètodes. x400 augments.

En resum, la sobreexpressió de VEGF en els illots pancreàtics portava a un increment en la vascularització i una desorganització de l'estructura de l'illot, sense modificar la massa de cèl·lula β en animals joves de dos mesos. No obstant, aquestes alteracions en el pàncrees endocrí no van anar acompanyades d'alteracions en l'homeòstasi de la glucosa.

A llarg termini, la sobreexpressió de VEGF desembocava en un procés inflamatori amb infiltració de macròfags i producció de citoquines. Aquest procés resultava més ràpid i agressiu en incrementar l'expressió de VEGF. Així, una baixa expressió de VEGF (Tg VEGF 2) donava lloc a una inflamació tardana que apareixia en animals d'un any, la qual s'associava a una disminució de la secreció d'insulina i intolerància a la glucosa. Aquesta inflamació juntament a l'alteració en la secreció d'insulina apareixien en animals més joves si es tractaven amb una dosi molt baixa de STZ, no diabetogènica pels ratolins controls.

Per contra, en animals amb una major expressió de VEGF (Tg VEGF 1) s'hi observava inflamació ja des dels 5 mesos, la qual conduïa també a una disfunció dels illots. En aquest mateixos animals, pocs mesos després, la inflamació s'agreujava i produïa una important infiltració de macròfags, producció de citoquines i fibrosi. Finalment, aquest procés desembocava en una important pèrdua de massa de cèl·lula de β i diabetis oberta.

V. DISCUSSIÓ.

PART I: ESTUDI DELS MECANISMES PELS QUALS IGF-I INDUEIX LA REGENERACIÓ DEL PÀNCREES ENDOCRÍ.

En el nostre laboratori s'havien generat ratolins transgènics que sobreexpressen el factor de creixement IGF-I específicament a les cèl.lules β (RIP-I/IGF-I). Aquests animals van permetre demostrar la capacitat de l'IGF-I de regenerar el pàncrees endocrí després de la inducció de diabetis experimental mitjançant STZ (George, 2002) i de protegir els illots enfront de la insulitis en un model transgènic autoimmune, els animals RIP-I/IFN- β (Casellas, 2006). Així doncs, aquests estudis suggerien que la sobreexpressió d'IGF-I al pàncrees *in vivo* podria constituir una teràpia per recuperar la massa de cèl.lula β en pacients diabètics. No obstant, caldria aprofundir en el coneixement de les vies d'acció de l'IGF-I i dels seus efectes sobre els illots pancreàtics, tant en animals sans com durant un procés diabètic. Per aquest motiu, en el present treball, vam caracteritzar els mecanismes pels quals la sobreexpressió d'IGF-I als illots revertia el fenotip diabètic induït amb STZ. A l'estudi dut a terme per George *et al.* es va observar que els ratolins control tractats amb STZ desenvolupaven una elevada hiperglucèmia i hipoinsulinèmia, mentre que els ratolins transgènics tractats esdevenien hiperglucèmics però que, gradualment, la glucèmia millorava fins arribar a valors propers als d'animals sans. Aquesta recuperació dels paràmetres metabòlics en els animals transgènics tractats amb STZ era paral·lela a un increment en la massa de cèl.lula β respecte els animals controls diabètics.

En el present treball es va realitzar un tractament amb STZ (5x40 mg/kg) per tal d'induir diabetis experimental. En aquest cas, els animals transgènics IGF-I tractats amb STZ van desenvolupar una hiperglucèmia de 300 mg/dl, sensiblement inferior a la dels ratolins controls, els quals van arribar a valors superiors a 400 mg/dl. Aquest resultat suggeria que els illots que sobreexpressen IGF-I estaven parcialment protegits de la citotoxicitat de la STZ. En primer lloc es va analitzar si aquest menor efecte tòxic de la STZ es podia explicar per una disminució de GLUT-2 (Wang, 1998), deguda a l'expressió del transgèn. Vam comprovar que l'expressió de GLUT-2 a la membrana de les cèl.lules beta era similar entre controls i transgènics. Per tant, el fet que els ratolins IGF-I mostressin una hiperglucèmia més moderada respecte els controls després del tractament amb STZ no podia estar relacionat amb una deficiència de GLUT-2.

Així doncs, la millora relativa en la glucèmia dels ratolins IGF-I tractats amb STZ respecte els controls també tractats suggeria que la sobreexpressió d'IGF-I en els illots protegia parcialment les cèl.lules β . Aquesta observació concordava amb els resultats que s'havien

obtingut anteriorment en el nostre laboratori, en que es va observar una disminució de la taxa d'apoptosi després del tractament amb STZ (George, 2002). Similarment, en altres estudis, s'ha demostrat un efecte anti-apoptòtic de l'IGF-I, ja que l'IGF-I protegeix els illots en cultiu contra la mort mediada per citocines pro-inflamatòries com IL-1 β , TNF- α o INF- γ (Mabley, 1997; Harrison M, 1998; Giannoukakis, 2000; Castrillo A, 2000).

Encara que es va descriure un menor percentatge de cèl.lules β apoptòtiques en els illots IGF-I després de la inducció de diabetis (George, 2002), els ratolins transgènics tractats desenvolupaven hiperglucèmia però, posteriorment, aquesta anava disminuint gradualment fins arribar a normoglucèmia. Aquest resultat suggeriria que es donava una pèrdua de massa de cèl.lula β seguida d'una recuperació d'aquesta. Això es va confirmar en mesurar la taxa de replicació de les cèl.lules β dos mesos després del tractament amb STZ (quan els ratolins transgènics estaven en procés de recuperació amb valors de glucèmia de 200 mg/dl). El nombre de cèl.lules β en proliferació era superior en els pàncrees dels transgènics tractats respecte els controls diabètics i, també, respecte els controls i transgènics sans. Per tant, després de la inducció d'un dany, l'expressió d'IGF-I als illots era capaç d'incrementar la replicació de les cèl.lules β , mentre que no s'observava en els illots dels ratolins transgènics sans. D'aquesta manera, la proliferació de les cèl.lules β induïda per IGF-I permetia la reversió de la diabetis experimental.

Tradicionalment, ha existit controvèrsia respecte la capacitat de regeneració de les cèl.lules β pancreàtiques i, si aquest procés podria tenir lloc per transdiferenciació de cèl.lules mare precursors o per duplicació de les cèl.lules β pre-existents (Halban, 2004a; Halban, 2004b; Butler, 2007). Tanmateix, recentment, en rosegadors, s'ha descrit la duplicació de les cèl.lules β com el principal mecanisme de manteniment de la massa de cèl.lula β a l'adult, així com durant el procés de regeneració que té lloc després d'una pancreatectomia parcial (Dor, 2004; Georgia, 2004; Teta, 2007). Fins i tot, s'ha demostrat que totes les cèl.lules β tenen la mateixa capacitat de proliferar, és a dir, no existeix un *pool* de cèl.lules amb una major predisposició a replicar (Brennand, 2007). Per tant, la demostració de la capacitat de proliferació de les cèl.lules β en ratolí està d'acord amb l'increment en cèl.lules β Ki67 positives en els animals IGF-I durant la reversió del procés diabètic.

El factor de creixement IGF-I estimula la proliferació i inhibeix l'apoptosi de les cèl.lules β (LeRoith, 1997) mitjançant la cascada de senyalització del seu receptor (IGF-IR), la PI3K i la

PKB o Akt, (Kauffmann-Zeh, 1997). En els illots dels ratolins transgènics, la sobreexpressió d'IGF-I, portava a un increment d'Akt fosforilat, indicant que aquesta cascada de senyalització del IGF-IR era activa. A més d'un augment de P-Akt, també s'hi va detectar una major quantitat d'Akt total. Possiblement, una activació crònica de la via conduïa a una major expressió d'alguns dels seus components.

L'expressió d'una forma constitutivament activa d'Akt en cèl.lules β d'animals transgènics dóna un increment en la replicació cel.lular i hiperplàsia dels illots (Bernal-Mizrachi, 2001; Tuttle, 2001). Així, Akt induïx la replicació de la cèl.lula β a través de diferents mecanismes. Akt fosforila el factor de transcripció FoxO1 i, d'aquesta manera, dóna lloc a la seva translocació a fora del nucli (Brunet, 1999; Accili, 2004; Okamoto, 2006). Aquest factor regula l'expressió de diferents gens implicats en la proliferació i la funcionalitat de les cèl.lules β (Nakae, 2002). Un dels gens regulats per FoxO1 és l'inhibidor de cicle cel.lular p27 (Chiappetta, 2002; Viglietto, 2002). Per altra banda, l'Akt pot fosforilar directament p27 i induir la seva exclusió fora del nucli, impedit el seu efecte de bloqueig del cicle cel.lular (Shin, 2002; Chiappetta, 2002). Els illots dels ratolins transgènics IGF-I mostraven també un increment en la fosforilació de FoxO1 i, aquest increment no anava acompanyat d'un augment en FoxO1 total, probablement perquè en aquest cas, es tractava d'un factor negatiu en l'acció pro-replicació de l'IGF-I. Com a conseqüència de la major fosforilació de FoxO1, es va observar una baixada dels nivells de RNA de p27 en aquests illots IGF-I mitjançant PCR quantitativa. Degut a la menor expressió de p27, juntament a una possible translocació d'aquest fora del nucli per l'acció de P-Akt, els illots transgènics presentaven una disminució en el marcatge nuclear de p27. S'ha demostrat que la inactivació de p27 en cèl.lules β porta a hiperplàsia dels illots i, a més, permet incrementar la replicació i la massa de cèl.lula β en models de diabetis tipus 2. Contràriament, la sobreexpressió de p27 en illots d'animals transgènics IGF-I frena la progressió del cicle i redueix la massa de cèl.lula β (Uchida, 2005). Així doncs, la disminució de p27 nuclear a les cèl.lules β dels animals transgènics IGF-I podia portar a un increment en la proliferació.

La principal ciclina dependent de quinasa (Cdk) implicada en la progressió del cicle cel.lular en cèl.lules β és la Cdk-4 i, de fet, una de les vies per les que p27 inhibeix el cicle cel.lular és per inactivació de la Cdk-4 (Malumbres, 2005). Els ratolins *knock-out* per Cdk-4 desenvolupen diabetis oberta per pèrdua de massa de cèl.lula β deguda a la disminució de la replicació, demostrant el paper clau de la Cdk-4 en el manteniment de la proliferació d'aquestes cèl.lules (Rane, 1999). Els illots dels ratolins transgènics IGF-I, al contrari que els dels controls,

mostraven un important marcatge per Cdk-4 en els nuclis de les cèl.lules β , tant abans com 10 dies després del tractament amb STZ, indicant que l'acció d'IGF-I devia estar en part mediada per aquesta Cdk.

Així doncs, els nostres resultats suggerien que els illots dels animals IGF-I sans mostraven una activació de la cascada del IGF-IR (un increment en P-Akt) que desenvolupava en una disminució de p27 i un increment de Cdk-4. No obstant, els illots dels ratolins transgènics no tractats amb STZ no mostraven un augment en la replicació de la cèl.lula β , ni en la quantitat de cèl.lules β . Aquest resultat suggeria que encara que els nivells de p27 estaven disminuïts i de Cdk-4 estaven incrementats, altres factors debien estar implicats, de manera que en els animals transgènics sans la maquinària del cycle cel.lular no estava totalment activa. Això portava a que, en últim terme, no es produís una hiperplàsia dels illots.

Les Cdks requereixen de la unió de les seves respectives ciclines per ser actives, així Cdk-4 s'ha d'unir a la ciclina D1, D2 o D3. A les cèl.lules dels mamífers, les ciclines D actuen com a "sensors" intracel.lulars dels estímuls extracel.lulars que promouen la proliferació (Sherr, 1999, Malumbres, 2005). S'ha descrit que la ciclina D3 s'expressa a nivells molt baixos en illots i que és poc important en la cèl.lula β , mentre que, les ciclines D1 i D2 s'expressen a nivells alts i tenen un important paper en el manteniment i expansió de la massa de cèl.lula β (Kushner, 2005; Kushner, 2006). En condicions normals, sense inducció de diabetis, els illots dels animals IGF-I mostraven uns nivells d'aquestes ciclines similars als dels illots controls. Així doncs, encara que es donés un augment de Cdk-4 en els illots transgènics, no s'observava un increment en les ciclines que l'activen. La falta d'aquest increment paral.lel en alguna de les ciclines podria explicar perquè un augment en Cdk-4 nuclear no induïa una major taxa de duplicació de les cèl.lules β transgèniques.

Després del tractament amb STZ, en els illots dels ratolins IGF-I, els nivells de RNA de ciclina D1 augmentaven més de dues vegades i mitja respecte els mateixos animals sense tractar o respecte els controls. Paral.lelament, també es donava un increment del marcatge de ciclina D1 nuclear, que podia ser degut a l'increment en el RNA, però també a la disminució de p27, ja que un dels seus mecanismes per inhibir la replicació és per la translocació de ciclines D a fora del nucli (Malumbres, 2005). D'aquesta manera, l'IGF-I incrementava els nivells del complex Cdk-4/ciclina D1 després del tractament amb STZ i, probablement, és així com augmentava el nombre de cèl.lules β en proliferació. Similarment, l'increment de la replicació de les cèl.lules β

induït per una activació crònica de l'Akt està associat a un increment en l'expressió de les ciclins D, i en l'activitat de Cdk-4 (Fatrai, 2006).

En els hepatòcits, la ciclina D1 és el principal mediador de la progressió del cicle cel·lular en resposta a la senyalització de la via PI3K-Akt, mentre que la ciclina D2 i D3 no semblen tenir un paper important (Albrecht, 1999). Contràriament, estudis amb animals geno-suprimits per les ciclins D1 i D2 específicament en les cèl·lules β indiquen que la ciclina D2 és imprescindible pel manteniment de la massa de cèl·lula β , mentre que la ciclina D1 tindria un paper accessori (Kushner, 2005; Kushner, 2006). No obstant, illots en cultiu transduïts amb adenovirus que expressen la ciclina D1 presenten un increment en la taxa de cèl·lules β BrdU positives (Cózar-Castellano, 2004). A més, la sobreexpressió de ciclina D1 en cèl·lula β d'animals transgènics dóna hiperplàsia dels illots (Zhang, 2005). Per tant, encara que la ciclina D1 no és imprescindible pel manteniment de la massa de cèl·lules β , és capaç d'incrementar-ne la proliferació. D'acord amb aquesta propietat de la ciclina D1, l'increment en l'expressió de la ciclina D1 en els ratolins IGF-I, després de la inducció de diabetis experimental, explicaria l'augment en la taxa de replicació. Així doncs, tots aquests resultats suggeririen que la ciclina D1 seria clau en moments en que es requereix un augment de la massa de cèl·lula β , per exemple durant la regeneració que té lloc en els ratolins transgènics IGF-I després del tractament amb STZ. El fet que IGF-I induxi un increment en l'expressió de la ciclina D1 només després del tractament amb STZ també concordaria amb els resultats que es van obtenir en sobreexpressar IGF-I en múscul de ratolins transgènics (Rabinovskiy, 2003). Aquests ratolins amb expressió d'IGF-I al múscul només mostraven cèl·lules positives per ciclina D1 durant la regeneració de les fibres musculars que tenia lloc després de la inducció d'un dany (Rabinovskiy, 2003). Per altra banda, les incretines, com la GLP-1, també indueixen la proliferació de les cèl·lules β i ho fan mitjançant la inducció transcripcional de la ciclina D1 (Frierichsen, 2006).

Una possible explicació de la major proliferació després del tractament amb STZ pot ser també que la hiperglucèmia incrementaria encara més l'activació de la via IGF-IR-Akt, ja que en estudis *in vitro* en illots i en cèl·lules MIN6 s'ha descrit que una pujada en la concentració de glucosa activa aquesta via directament (Srinivasan, 2002; Paris, 2003) o, a través d'un increment en Irs-2 (Lingohr, 2002). A més, la regulació de l'expressió pel promotor RIP-I és similar a la de la insulina endògena i, per tant, és activada principalment per glucosa (Walker, 1983), de manera que durant el procés diabètic, l'IGF-I del transgèn s'hauria d'expressar a un nivell més elevat.

Per últim, la translocació dels complexos Cdk-4/ciclina D a l'interior del nucli té lloc gràcies al reconeixement de seqüències de localització nuclear, però concretament la ciclina D1 no presenta aquesta senyal i, per tant, la translocació al nucli depèn d'altres proteïnes encara no descrites (Wierod, 2007). Així doncs, no podem descartar que durant el procés diabètic s'activin aquestes proteïnes (i no abans) i que aquestes transloquessin el complex al nucli i, així, podrien incrementar la taxa de replicació.

Els illots dels ratolins transgènics IGF-I sans presentaven un increment en l'expressió de p21. Paral·lelament a la pujada de la ciclina D1, els nivells de RNA de p21 es normalitzaven en els illots IGF-I després del tractament amb STZ. Altres models transgènics que expressen factors de creixement a les cèl·lules β o tenen l'Akt activa també presenten un increment de p21, com per exemple els ratolins que sobreexpressen el factor de creixement dels hepatòcis (HGF) (Garcia-Ocaña, 2000). També mostren una major expressió de p21, els ratolins transgènics que expressen una forma constitutivament activa de l'Akt a la cèl·lula β (Fatrai, 2006). No obstant, la funció de p21 al cycle de la cèl·lula β no és del tot clara. En altres teixits, se sap que p21 és una proteïna d'unió als complexos Cdk-ciclina però, no està clar si actua com un inhibidor del cycle cel·lular o bé, ajuda a la progressió del cycle actuant com una *xaperona*. Per una banda, en uns pocs tipus cel·lulars diferents de la cèl·lula β , sembla que ajudaria a l'ensamblatge de la Cdk-4 amb la ciclina D ajudant a la seva translocació al nucli i, per tant, ajudant a la seva activació. No obstant, en la majoria de teixits, p21 s'ha descrit com un gen supressor de tumors (Malumbres, 2005). D'acord amb aquesta descripció, en creuar ratolins que sobreexpressen p21 a les cèl·lules β amb ratolins transgènics que presenten un increment en la massa de cèl·lula β per expressió d'HGF, s'observa un bloqueig de la hiperplàsia dels illots. Així doncs, un increment de p21 induïda per factors mitogènics per la cèl·lula com, com l'HGF o el propi IGF-I, "frenaria" la progressió del cycle cel·lular evitant la formació d'insulinomes (Cózar-Castellano, 2006b). Per tant, l'increment de ciclina D1 i la disminució de p21 en els illots dels ratolins IGF-I només després del tractament amb STZ, explicarien que la replicació de les cèl·lules β incrementés només durant el procés diabètic i es mantingués a una taxa normal en animals transgènics sans.

Així doncs, aquest estudi indicava que l'expressió local d'IGF-I podia induir la regeneració dels illots mitjançant la replicació de les cèl·lules β residuals durant el procés diabètic. No obstant, en humans no està clara la contribució de la proliferació de les cèl·lules β al manteniment i l'expansió de la massa de cèl·lula β (Butler, 2007). Tanmateix, s'ha pogut detectar proliferació de cèl·lules β pre-existents en alguns casos (Meier, 2006). Així doncs, IGF-I podria

ser un factor d'interès pel tractament de la diabetes, no només com a inductor de la proliferació, sinó com a factor anti-apoptòtic (George, 2002) i anti-inflamatori (Casellas, 2006).

Tot procés de desenvolupament o de regeneració d'un òrgan o teixit requereix d'un procés d'angiogènesi paral·lel que formi la vascularització pel manteniment d'aquest òrgan o teixit en creixement (Lammert, 2003a; Konstantinova, 2004; Beaudry, 2007). S'ha descrit que l'IGF-I incrementa l'expressió de VEGF, el principal factor pro-angiogènic, en diversos tipus cel·lulars (Miele, 2000). Per altra banda, s'ha descrit que les cèl·lules endotelials aporten senyals de supervivència als teixits que suporten (Konstantinova, 2004; Nikolova, 2006; Nikolova, 2007). Per aquest motiu vam estudiar la producció de VEGF i la vascularització dels illots dels animals transgènics IGF-I. Així, es va detectar un augment en els nivells de proteïna VEGF en els illots transgènics IGF-I. No obstant, no s'hi va trobar un increment en la vascularització insular. Això podria ser el resultat de que es necessitessin altres factors pro-angiogènics, a més de VEGF, per induir la formació de vasos als illots (Carmeliet 2005; Ferrara, 2005). Tanmateix, la gensupressió de VEGF específicament a les cèl·lules β donava illots amb una menor vascularització i sense fenestracions (Lammert, 2003a).

Alternativament, en aquests illots transgènics IGF-I, el factor VEGF podria estar realitzant una funció diferent de la inducció de creixement dels vasos. Així, VEGF podria estar regulant la permeabilitat i la formació de fenestracions a l'endoteli i el manteniment de la membrana basal dels capil·lars (Lammert, 2003b; Brissova, 2006). L'endoteli i la seva membrana basal en illots IGF-I també podrien estar implicats en el procés de protecció enfront del tractament amb STZ i en la regeneració, ja que s'ha descrit que l'ECM dels capil·lars dels illots induïxen la proliferació de les cèl·lules β i l'expressió de la insulina (Nikolova, 2006; Nikolova, 2007).

Per altra banda, els illots pancreàtics expressen el factor pro-angiogènic, VEGF, però també gens anti-angiogènics (com el Factor Derivat de l'Epiteli Pigmentari o PEDF i l'endostatina) (Olsson, 2006). Així doncs, s'estableix un equilibri i la massa de cèl·lules endotelials al pàncrees endocrí en condicions fisiològiques es manté constant, amb una baixa taxa de renovació (Olsson, 2006). Així, els illots transgènics IGF-I, paral·lelament a la sobreexpressió de VEGF, incrementaven la producció del factor anti-angiogènic PEDF. Aquest resultat explicaria que un increment de VEGF, en els illots d'aquests animals, no donés lloc un augment en la vascularització, que podria alterar la funcionalitat de l'illot.

No obstant, no es podria descartar el paper del VEGF en la protecció i el manteniment de la massa de cèl.lula β en els animals transgènics RIP-I/IGF-I. Així com tampoc la seva implicació i la dels capil.lars dels illots en la funcionalitat del pàncrees endocrí.

PART II: ESTUDI DEL PAPER DEL VEGF I DE L'ENDOTELI VASCULAR EN LA FUNCIO I LA VIABILITAT DEL PANCREES ENDOCRÍ.

La vascularització dels illots de Langerhans juga un paper important en la seva funció, ja que regula l'arribada dels nutrients i dels diferents senyals humorals a les cèl·lules endocrines juntament a l'accés de les hormones secretades per l'illot al torrent circulatori (Brunicardi, 1996; Cabrera, 2006; Olsson, 2006; Ballian, 2007). Per aquest motiu, estan molt vascularitzats i presenten capil·lars molt permeables, amb un endoteli fenestrat (Lammert, 2003b). Així, la permeabilitat i el fluxe de la microcirculació dels illots controlen la secreció de les diferents hormones. Recentment, alteracions en la vascularització dels illots han estat relacionades amb el desenvolupament de diabetis (Olsson, 2006; Ballian, 2007). Així, s'han trobat deficiències en el flux sanguini, en l'estructura vascular i en la permeabilitat dels vasos de l'illot en diferents models de diabetis tant tipus 1, com els ratolins NOD (Papaccio, 2002) o tipus 2, com les rates GK (Carlsson, 2002).

A més, les cèl·lules endotelials s'han relacionat amb el desenvolupament de diabetis ja que permeten l'adhesió i la infiltració a dins l'illot de leucòcits. L'adhesió de leucòcits a aquest endoteli vascular, seguida de la migració transendotelial són processos essencials pel desenvolupament de la diabetis tipus 1 (Yang, 2007). Així, en diferents models animals de diabetis tipus 1: en ratolins NOD (Balasa, 2000), o en rates BB (Nakhoda, 2001), s'ha detectat l'expressió de molècules d'adhesió per cèl·lules inflamatòries a les cèl·lules endotelials.

Per altra banda, les cèl·lules endotelials participen activament en els processos de desenvolupament i regeneració, ja que emeten senyals que indueixen el creixement i la diferenciació en diferents òrgans i teixits (Lammert, 2003b; Konstantinova, 2004; Beaudry, 2007). Per exemple, s'ha demostrat que durant el desenvolupament del fetge la manca de cèl·lules endotelials impedeix la migració i la proliferació dels hepatoblasts (Matsumoto, 2001). A més, les cèl·lules endotelials, en resposta a VEGF, produeixen factors mitogènics pels hepatòcits (Lecouter, 2003) i, així, indueixen la seva proliferació principalment després d'un dany. També, durant el desenvolupament del pàncrees, l'endoteli subministra senyals que indueixen la seva formació i la diferenciació de les cèl·lules endocrines (Lammert, 2001). Les cèl·lules β , a més, requereixen de les cèl·lules endotelials dels illots perquè elles, a diferència de la resta del pàncrees, no formen matriu extracel·lular pròpia i requereixen de la matriu

extracel·lular (ECM) de les cèl·lules endotelials dels capil·lars. Aquesta ECM indueix la síntesi d'insulina i la proliferació i supervivència de les cèl·lules β (Nikolova, 2006; Nikolova, 2007).

Encara que els illots expressen diversos factors angiogènics, el principal regulador de la permeabilitat dels capil·lars dels illots és el VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Kuroda, 1995). A més, també juga un paper important en la formació de la vascularització dels illots durant el desenvolupament embrionari, així com durant la formació d'un nou illot a l'adult (Brissova, 2006). Per aquest motiu, VEGF és expressat a nivells molt alts en el pàncrees primigeni i, en el pàncrees adult, durant el procés de regeneració que té lloc després d'una pancreatectomia parcial (Chen, 1999). Per altra banda, la seva elevada expressió en el pàncrees durant períodes pre-natals, també respon a la seva funció com a mitogen de les cèl·lules epitelials dels ductes pancreàtics (Oberg-Welsh, 1997; Rooman, 1997). Així, podria estar implicat de forma indirecta en el procés de neogènesi de les cèl·lules β a partir de les cèl·lules ductals.

Així doncs, en aquest treball vam estudiar el paper del factor de creixement VEGF i de la vascularització de l'illot en la funció del pàncrees endocrí en condicions fisiològiques, així com la seva implicació durant el procés diabètic. Hem obtingut ratolins transgènics que sobreexpressen VEGF a les cèl·lules β del pàncrees. El gen VEGF expressa primerament un RNA immadur que per *splicing* alternatiu dona diferents isoformes (Byrne, 2005; Carmeliet, 2003; Ferrara, 2005). D'aquestes es va triar la isoforma 164, ja que és la més activa biològicament i, a més, presenta una capacitat de difusió intermitja, fet que permet que una part quedi retinguda a l'ECM de l'endoteli i l'altra part difongui cap a l'exterior de l'illot. Per tal de dirigir l'expressió del gen quimèric específicament a les cèl·lules β , es va utilitzar el promotor del gen de la insulina 1 de rata (RIP-1). Es van mantenir dues línies RIP-1/VEGF, una amb una alta expressió del gen quimèric (VEGF 1) i l'altra, amb una expressió més moderada (VEGF 2). Aquest fet va permetre avaluar l'efecte que podia tenir un grau diferent d'expressió de la proteïna VEGF a cadascuna de les línies.

VEGF és considerat el factor pro-angiogènic més important (Byrne, 2005; Carmeliet, 2003; Ferrara, 2005). Així doncs, en primer lloc, es va caracteritzar la vascularització dels illots a les dues línies. Mitjançant el doble marcatge per col·lagen IV (Yurchenco, 1990) i insulina es va delimitar l'estructura dels vasos en el pàncrees endocrí. Els illots dels animals transgènics d'ambdues línies mostraven un engruïment de la membrana basal i un increment important en la quantitat de vasos dins dels illots. Aquest resultat indicava, doncs, que VEGF és un important

regulador positiu de la microcirculació insular, i que la seva sobreexpressió induïa el creixement d'endoteli en els illots. A més, concorda amb els resultats que mostren una deficient vascularització en el pàncrees endocrí en els ratolins en que s'havia inactivat el gen VEGF específicament a les cèl.lules β (RIP)VEGF^{-/-} (Lammert, 2003b; Brissova, 2006). Aquesta hipervascularització dels illots dels animals Tg VEGF 1 i 2 no es va observar en el pàncrees exocrí. Per contra, s'havia observat que els ratolins transgènics Pdx-1/VEGF mostren un increment en el nombre de vasos en tot el pàncrees (Lammert, 2001). Aquesta diferència és deguda al patró d'expressió del transgèn durant el desenvolupament embrionari. Així, Pdx-1 comença a expressar-se el dia e8.5 i ho fa a tot el pàncrees primigeni i, posteriorment, la seva expressió es limita a les cèl.lules β (Campbell, 2002; Babu, 2007). En canvi, el gen de la insulina s'expressa a partir del dia e9.5 i ho fa al llinatge de les cèl.lules β (Melton, 2004; Habener, 2005). Per tant, la hipervascularització en el pàncrees exocrí dels ratolins Pdx-1/VEGF s'origina en els primers estadis del desenvolupament pancreàtic, quan el transgèn s'expressa a tot l'òrgan i, aquest increment en l'endoteli de tot l'òrgan porta a un major número d'illots.

Les cèl.lules endotelials de la microvascularització dels illots són molt permeables i fenestrades, característiques relacionades amb la seva funció: modulació de l'arribada de senyals i de la secreció d'hormones (Olsson, 2006; Ballian, 2007). El factor VEGF també és conegut com a VPF (factor de permeabilitat vascular) i és el principal regulador de la permeabilitat i de la formació de fenestracions a l'endoteli vascular de l'illot (Lammert, 2003b; Kamba, 2006). Per estudiar la permeabilitat dels vasos dels illots, es va realitzar una injecció de dextrà conjugat amb FITC (dextrà-FITC) i es va observar que en la major part de la vascularització dels illots transgènics no hi havia extravassació d'aquesta molècula. Per tant, una sobreexpressió de VEGF no incrementava la permeabilitat dels capil.lars a molècules del tamany del dextrà. No obstant, cal considerar que l'engruiximent de la membrana basal podia impedir que les molècules de dextrà extravassessin, encara que es donés una major permeabilitat a les cèl.lules endotelials.

Encara que la senyal del dextrà-FITC no s'observava per fora de la membrana basal de l'endoteli, sovint els illots dels animals transgènics, tant VEGF 1 com de VEGF 2, mostraven agrupacions de cèl.lules envoltades de col.lagen IV que no formaven tubs o conductes. Molt probablement es tractava de cèl.lules endotelials que havien proliferat o havien estat reclutades, però que no arribaven a constituir vasos correctament. L'angiogènesi és un procés complex que implica molts factors diferents. Així, encara que VEGF n'és considerat el principal regulador positiu, no n'és l'únic. Per exemple, TGF- β és una molècula pro-angiogènica imprescindible,

que no només té un efecte sobre les cèl.lules endotelials, sinó també sobre les cèl.lules que han de formar la musculatura llisa dels vasos i, sobre els pericits (Carmeliet, 2005; Ferrara, 2005). Per tant, per un correcte procés angiogènic calen molt altres factors a més de VEGF. A més, s'ha descrit que VEGF indueix la formació de vasos mitjançant un gradient molt determinat de concentració que permet la migració de les cèl.lules endotelials i que indueix el desenvolupament d'una forma tubular (Carmeliet, 2005; Ferrara, 2005). En els ratolins transgènics RIP-I/VEGF, però, no se sap si VEGF és secretat seguint un gradient fisiològic com el que mostra el VEGF endogen. Així doncs, l'estudi dels animals (RIP)VEGF^{-/-} demostra un paper no redundant en el desenvolupament de la microcirculació insular (Lammert, 2003b; Brissova, 2006), però els vasos aberrants en els illots dels ratolins RIP-I/VEGF demostraven que no és l'únic factor necessari per una correcta morfogènesi vascular en els illots.

Actualment es considera per molts autors que la circulació sanguínia en els illots de Langerhans de rosegadors segueix un sentit "no $\beta \rightarrow \beta$ " (Brunicardi, 1996; Cabrera, 2006). Aquesta direccionalitat permetria la regulació intra-illot de la funció endocrina, ja que seguint aquest patró, les cèl.lules β regularien la secreció de les hormones de les altres cèl.lules. Així, estudis en ratolí i rata relacionen la distribució de les cèl.lules no- β i β amb el recorregut dels capil.lars dins l'illot. Per tant, una alteració en la vascularització juntament a un increment en la quantitat d'endoteli i de matriu extracel.lular podrien modificar l'arquitectura típica dels illots murins, amb les cèl.lules β al centre i la resta a la perifèria. De fet, els illots dels animals transgènics VEGF 1 i VEGF 2 a l'edat de dos mesos estaven desorganitzats, amb les cèl.lules α distribuïdes per tot l'illot.

Els illots de Langerhans estan envoltats d'una càpsula formada per cèl.lules de Schwann i aquesta envolta es desestructura en alterar-se l'arquitectura de l'illot (Burriss, 2007). En diversos models animals de diabetis tipus 2 que presenten desorganització dels illots, l'envolta de cèl.lules de Schwann apareix interrompuda. Per altra banda, encara que VEGF actua principalment sobre les cèl.lules endotelials, uns pocs tipus cel.lulars diferents de les cèl.lules endotelials expressen també els receptors de VEGF, i d'entre aquests, cal destacar les cèl.lules de Schwann (Sondel, 1999). Així, VEGF té un efecte quimiotàctic sobre aquestes cèl.lules i, alhora, incrementa la seva supervivència i la seva proliferació *in vitro* (Storkebaum, 2004). En estudiar la morfologia de la càpsula de Schwann, mitjançant el marcatge contra GFAP, es va observar que els illots controls mostraven una fina envolta positiva per GFAP. En canvi, els illots dels ratolins transgènics d'ambdues línies als dos mesos, mostraven una càpsula interrompuda. A més, es va observar un

important increment en el marcatge contra GFAP. Així, la sobreexpressió de VEGF induïa un augment en la presència de cèl.lules de Schwann en els illots, probablement per un procés de quimiotaxis i proliferació d'aquestes cèl.lules.

S'ha descrit que les cèl.lules endotelials secreten les metal.loproteïnases MMP-2 i MMP-9 en resposta a VEGF. Aquestes metal.loproteïnases permeten la degradació de la matriu extracel.lular perquè les cèl.lules endotelials puguin migrar i formar els nous vasos (Unemori, 1992; Carmeliet, 2003, Carmeliet, 2005; Ferrara, 2005). En concret l'expressió de MMP-2 en els illots dels animals Tg VEGF 1 i 2 era superior respecte els illots dels ratolins controls. Possiblement, aquesta major expressió donava un increment en el remodelatge de l'ECM dels illots transgènics, fet que explicaria, en part, l'alteració en la distribució cel.lular.

L'expressió de MMPs als illots es dona de forma normal i es relaciona amb la capacitat d'expansió dels illots durant períodes amb una major demanda d'insulina (Zhou, 2005). No obstant, en les rates ZDF (Zucker Diabetic Fatty rats) té lloc un increment descontrolat de l'expressió de MMPs (Li, 2006), sobretot de MMP2, que és considerat la causa de la desorganització de l'illot, probablement per degradació descontrolada de l'ECM. Així, de la mateixa manera que en els illots transgènics VEGF, els illots de les rates ZDF són desestructurats i mostren un important increment en l'expressió de MMP-2 (Zhou, 2005).

Dins d'un teixit, la localització de les cèl.lules no només depèn del manteniment de l'ECM, sinó també de les unions intercel.lulars (Kreis, 1993; Alberts, 2000). Les molècules d'adhesió cel.lular (CAM) permeten la unió entre cèl.lules, així com el seu reconeixement. L'E-cadherina s'ha descrit com una de les principals CAM en el manteniment de les adhesions entre les diferents cèl.lules endocrines de l'illot i la inactivació de la seva expressió dona lloc a alteracions en l'organització dels illots (Dahl, 1996; Hauge-Evans, 1999). Així doncs, tant l'increment en MMP-2 com la disminució dels nivells d'E-cadherina poden estar relacionats amb l'alteració en la distribució de les cèl.lules α i β observada en els illots dels ratolins transgènics VEGF d'ambdues línies.

La sobreexpressió de VEGF en el pàncrees podria influenciar el nombre d'illots i/o la massa de cèl.lula β a través de diferents mecanismes. Per una banda, tal i com s'ha descrit anteriorment, les cèl.lules endotelials participen activament en els processos de desenvolupament i regeneració d'òrgans i teixits, emetent senyals que indueixen el creixement i la diferenciació

(Ondine, 2003; Lammert, 2003a). En concret, la sobreexpressió de VEGF al pàncrees en els ratolins transgènics Pdx-1/VEGF porta a un increment en la vascularització del pàncrees i, com a conseqüència, a un augment de tres vegades en el nombre d'illots (Lammert, 2001). A més, estudis amb explants han demostrat que, durant el desenvolupament embrionari, l'endoteli vascular del pàncrees indueix la formació d'illots. Per altra banda, VEGF és mitogènic per les cèl.lules epitelials dels ductes pancreàtics (Oberg-Welsh, 1997; Rooman, 1997), de manera que, podria incrementar el nombre de precursors de cèl.lules β durant el desenvolupament i, així, indirectament, incrementar la neogènesi d'illots.

No es van observar diferències significatives en el número d'illots/àrea de pàncrees entre els animals transgènics d'ambdues línies i els controls als dos mesos d'edat. Per tant, encara que el VEGF procedent de l'expressió del transgèn s'expressava des del dia e9.5 del desenvolupament, ni el seu possible efecte mitogènic sobre l'epiteli dels ductes, ni el seu efecte pro-angiogènic, van incrementar la formació d'illots. En els animals transgènics Pdx-1/VEGF, l'expressió primerenca a tot l'òrgan indueix un increment en l'endoteli dels grans vasos, entre ells l'aorta i, són aquests grans vasos els que incrementen la formació d'illots. Per contra, els ratolins RIP-I/VEGF només mostraven hipervascularització a nivell del pàncrees endocrí, i no presentaven més illots que els controls. Així doncs, aquest resultat concordava amb els estudis que indiquen que només l'endoteli de l'aorta és capaç d'induir la diferenciació de cèl.lules β (Yoshitomi, 2003).

Els ratolins transgènics VEGF 1 i VEGF 2 no presentaven un increment en la massa de cèl.lula β respecte els controls. Tampoc s'observà cap diferència en les taxes de replicació i apoptosi. Per contra, Johanson, *M et al* van demostrar que VEGF pot induir la replicació de les cèl.lules β d'una forma indirecta. En el seu estudi, descriuen que durant l'embaràs (una situació amb una major demanda d'insulina), les cèl.lules β secreten més VEGF, el qual activa la producció d'HGF per part de les cèl.lules endotelials de l'illot, i llavors és aquest HGF el que indueix la replicació de les cèl.lules β (Johanson, 2006). Aquesta diferència pot ser deguda a que, a les rates gestants, l'increment en l'expressió de VEGF comença en un moment donat de l'edat adulta i no durant el període pre-natal. A més, molt probablement, durant la gestació es produeixen altres canvis hormonals i variacions en la glucèmia que també ajuden a incrementar la proliferació de les cèl.lules β .

Els animals deficientes en VEGF específicament a les cèl·lules β , mostren una vascularització dels illots alterada, amb un menor nombre de capil·lars i una manca total de fenestracions a l'endoteli. Aquestes alteracions en la vascularització insular desenvoquen en una deficient secreció d'insulina i en intolerància a la glucosa (Lammert, 2003b). Per tant, en aquest treball vam estudiar si la desorganització de l'illot observada en els ratolins transgènics VEGF podia disminuir la secreció d'insulina o, si al contrari, l'efecte de VEGF com a permeabilitzador de l'endoteli podia incrementar els nivells d'insulina sèrics en resposta a glucosa. El metabolisme glucídic dels animals transgènics d'ambdues línies als 2 mesos d'edat era normal, amb valors de glucosa i insulina circulants i una secreció d'insulina en resposta a glucosa *in vivo* similar a la dels ratolins controls. Aquests resultats contrastaven amb els trobats en diversos models animals de diabetis tipus 2. Així, les rates ZDF presenten illots desorganitzats, amb una certa acumulació de col·lagen i increment en l'expressió de MMPs i desenvolupen intolerància a la glucosa i, finalment diabetes (Zhou, 2005). En els illots de rates GK (Goto-Kakazaki), que també són un model de diabetis tipus 2, l'expressió de MMP-2, MMP-9 i diversos col·làgens també està incrementada donant illots desorganitzats, de forma similar a com succeeix en els illots VEGF, però a diferència d'aquests, presenten una disminució de la secreció d'insulina (Homo-Delarche, 2006; Song, 2006).

Diversos estudis han relacionat la desestructuració del pàncrees endocrí i/o la disminució d'E-cadherina amb una disminució en la secreció d'insulina (Dahl, 1996; Hauge-Evans, 1999; Bosco, 2007). S'ha descrit que els contactes cèl·lula β -cèl·lula β són necessaris per la correcta funció del pàncrees endocrí, ja que la comunicació entre cèl·lules β permet oscil·lacions de la concentració de Ca^{2+} intracel·lular coordinades en resposta als secretagogs (Hauge-Evans, 1999; Cabrera, 2006). Així, la disminució de l'E-cadherina als illots, porta a una distribució alterada de les cèl·lules endocrines i a una menor secreció d'insulina, degut a aquesta deficient comunicació entre cèl·lules β (Dahl, 1996; Bosco, 2007). No obstant, els illots dels ratolins transgènics VEGF 1 i 2 estaven desestructurats amb una menor expressió d'E-cadherina i, no presentaven alteracions en la funcionalitat dels illots *in vivo*, ni intolerància a la glucosa. Similarment, els ratolins geno-suprimits pel gen N-CAM presenten illots totalment desorganitzats, però es mantenen normoglicèmics i no són intolerants a la glucosa, amb un correcte funcionament dels illots (Esni, 1999). Per tant, els nostres estudis suggeririen que una arquitectura anòmala del pàncrees ni la disminució d'E-cadherina no hauria de desenvolupar necessàriament en una menor secreció d'insulina.

La correcta homeòstasi de la glucosa en els animals transgènics VEGF 1 i 2 joves es correlacionava amb un manteniment de la massa de cèl.lula β similar a la dels controls. Contràriament, els animals Pdx-1/VEGF presenten un increment de la massa de cèl.lula β que porta a una major insulinèmia i, com a conseqüència, a una disminució en la glucèmia (Lammert, 2001).

No obstant, els ratolins Tg VEGF 1, amb l'expressió de VEGF més elevada, desenvolupaven hiperglucèmia a partir del setè mes de vida. A més, a l'edat d'un any, la totalitat dels animals eren diabètics. La hiperglucèmia diabètica en els ratolins Tg VEGF 1 venia acompanyada per una disminució dels nivells d'insulina circulants en alimentació a partir dels 8 mesos d'edat. Prèviament a l'aparició d'hiperglucèmia, a l'edat de cinc mesos, aquests animals eren intolerants a la glucosa i presentaven una disminució en la secreció d'insulina *in vivo*. Així doncs, mostraven un estat pre-diabètic amb una deficient funció del pàncrees endocrí abans del desenvolupament de diabetis oberta. Aquesta pèrdua de funcionalitat dels illots anterior a l'aparició de la hiperglucèmia diabètica s'ha descrit en diferents models de diabetis tipus 1 i 2 (Tokuyama, 1995; Hoog, 1996; Chankiewitch, 2006; Yang, 2007) i també en pacients humans (Kahn, 2001; Atkinson, 2004; Butler, 2007).

Els ratolins transgènics VEGF 1 als 5 mesos de vida, quan eren intolerants a la glucosa, presentaven una desestructuració del pàncrees endocrí, amb cèl.lules α tant a la perifèria com a l'interior dels illots, juntament a un increment en la vascularització. No obstant, les alteracions als 5 mesos eren similars a les descrites als dos mesos d'edat, quan els animals responien normalment a una sobrecàrrega de glucosa. Així doncs, la disminució en la secreció d'insulina *in vivo* no tenia perquè ser deguda a la desestructuració dels illots.

Els ratolins transgènics de la línia 1 als 8 mesos presentaven una pèrdua significativa de massa de cèl.lula β , que explicaria la disminució en la insulinèmia i l'aparició de diabetis. A més, les poques cèl.lules β que mostraven apareixien separades i disperses pel pàncrees. Donava un aspecte com si els illots s'hagessin "trencat", a diferència d'altres models diabètics, com els ratolins NOD, en que la majoria de cèl.lules productores d'insulina són destruïdes i les restants no es dispersen pel pàncrees, sinó que els illots apareixen com agrupacions desorganitzades on hi ha penetració de cèl.lules no- β entre les poques cèl.lules β residuals (Orci, 1978; Unger, 1981). A més, en els transgènics VEGF 1 diabètics, s'hi observava una important acumulació de cèl.lules que envaïen gairebé tot el teixit i que mostraven una ECM molt rica en col.lagen IV. Per tant,

molt probablement es tractava de cèl.lules endotelials, ja que aquestes es caracteritzen per una ECM molt rica en col.lagen IV.

La menor massa de cèl.lula β en els animals Tg VEGF 1 als 8 mesos respecte els mateixos animals VEGF més joves, indicava una mort d'aquestes cèl.lules. No obstant, no es va detectar un increment en la taxa de cèl.lules β apoptòtiques. Aquest resultat podia suggerir que la mort no havia tingut lloc pel mecanisme de l'apoptosi, sinó per necrosi. Així, les cèl.lules β d'illots en cultiu exposats a agents oxidants moren per necrosi més que no pas per apoptosi (Heller, 1995). Alternativament, podia ser degut a que l'onada d'apoptosi s'hagués donat abans del moment de la quantificació. Cal considerar que l'apoptosi és un procés que dura poc i les cèl.lules apoptòtiques són fagocitades ràpidament (Cameron, 2000) i, això en pot dificultar la detecció.

En els pàncrees dels ratolins Tg VEGF 1 diabètics, la gran acumulació de col.lagen IV donava un aspecte de teixit fibròtic. Aquest procés era similar, però més greu, que el descrit en els illots de les rates GK (Homo-Delarche, 2006). S'ha descrit la fibrosi com el procés pel qual el teixit normal és substituït per teixit connectiu degut a l'acumulació d'ECM, principalment col.làgens (Wynn, 2008). Després de danyar un teixit, les cèl.lules s'activen i secreten citocines pro-inflamatòries, que indueixen la remodelació de l'ECM i que atreuen leucòcits. Els primers a respondre són macròfags i neutròfils, que eliminen les restes de cèl.lules mortes i que, produeixen citocines pro-angiogèniques (principalment VEGF) i factors de creixement que permeten la regeneració correcta del teixit danyat (Abbas, 2000; Schmid-Schönbein, 2006). Quan la inflamació és crònica, es produeixen citocines i VEGF durant llargs períodes de temps, els quals indueixen que s'acumuli ECM en excés, donant fibrosi que, finalment, resulta en una disfunció i mort de les cèl.lules de l'òrgan (Wynn, 2008). Així doncs, els processos de fibrosi de diversos òrgans (com la cirrosi al fetge o l'Alzheimer al cervell) compartrien amb el procés fibròtic del pàncrees dels transgènics VEGF 1 diverses característiques: en primer lloc, una remodelació dels vasos, una acumulació d'ECM a llarg termini i, finalment, la disfunció de l'òrgan (Wynn, 2008). Així, en els animals Tg VEGF 1, la sobreexpressió crònica de VEGF donava lloc a la invasió del teixit endocrí per col.lagen, desenvocant en la mort de les cèl.lules β . Un altre exemple de la toxicitat d'un procés fibròtic en el pàncrees són els ratolins transgènics que sobreexpressen HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor) als illots. Aquests animals mostren un important acúmulo de col.lagen i fibroblasts que incrementa amb l'edat, substituint el teixit pancreàtic per teixit connectiu, similarment a com succeïa en els transgènics VEGF 1. Finalment, aquest elevat acúmulo d'ECM dona fibrosi i, com a conseqüència,

hiperglucèmia diabètica, tal i com observàvem en els Tg VEGF 1 (Means, 2003). L'aparició de diabetis en aquests animals podria seguir un mecanisme similar a la diabetis que desenvolupen alguns malalts de fibrosi quística, com a conseqüència d'una pancreatitis i d'alteracions en la pròpia cèl.lula β . Aquests individus pateixen una diabetis intermitja entre tipus 1 i tipus 2 que comença amb intolerància a la glucosa a l'adolescència-juventud i acaba en diabetis oberta (Mackey, 2003; Krysa, 2007).

Els processos d'inflamació inclouen el reclutament i extravassació de leucòcits i, l'acumulació de líquid intersticial en el lloc del dany. Aquest procés requereix vasodilatació i un increment de la permeabilitat capil.lar i, sovint també, la formació de nous vasos. Per aquest motiu es produeix VEGF abundantment durant una inflamació (Schmid-Schönbein, 2006). La fibrosi sovint és conseqüència d'una inflamació crònica i, la producció de VEGF és comú en ambdós processos. Així, en els pàncrees dels ratolins Tg VEGF 1, paral.lelament al procés fibròtic, podia donar-se una inflamació. Es va estudiar la presència d'infiltrats als dos, cinc i vuit mesos d'edat en els illots de controls i transgènics VEGF 1. En els ratolins transgènics joves de dos mesos no es van detectar leucòcits en els illots; tanmateix, progressivament, aquests apareixien i el seu nombre augmentava amb l'edat. Dins dels infiltrats es van identificar principalment macròfags. Aquest resultat es podria explicar, per una banda, per l'acció quimioattractant directa del VEGF sobre els macròfags a través del VEGFR-1 (Barleon, 1996; Sawano, 2001). Similarment s'ha demostrat que VEGF és necessari pel desenvolupament d'arterioesclerosi, ja que és l'encarregat d'atreure els monòcits/macròfags (Zhao, 2002). Per altra banda, es podria explicar per l'acció d'altres citoquines produïdes per l'endoteli en resposta a VEGF, que tindrien un efecte pro-inflamatori, atraient també macròfags. També podia ser degut a l'acumulació de matriu extracel.lular i la mort de cèl.lules, de manera que es recluten macròfags per fagocitar les restes cel.lulars.

S'ha descrit que les cèl.lules endotelials produeixen MCP-1 quan són sotmeses a elevades concentracions de VEGF (Yamada, 2003). Així doncs, es va mesurar aquesta citoquina pro-inflamatòria en els illots dels animals Tg VEGF 1 a l'edat de cinc mesos, quan els animals mostraven disfunció dels illots, prèvia a la diabetis oberta. Els illots d'aquests animals mostraven un increment en l'expressió de MCP-1, que, devia induir el reclutament i l'activació dels macròfags (probablement en col.laboració amb VEGF) (Mackay, 2001; Ehnrfelt, 2004).

Conjuntament a l'increment de MCP-1, també es va observar una major expressió d'altres citocines: IL-1 β , TNF- α i IL-6. Aquestes citocines molt probablement eren secretats pels leucòcits infiltrants (Mackay, 2001; Schmid-Schönbein, 2006) i, a més, estarien implicades en el reclutament de més cèl.lules immunes, per exemple, IL-1 β és la responsable principal d'atreure macròfags cap als illots en ratolins NOD (Chen, 2000). També, en malalties pulmonars, s'ha observat que VEGF indueix la producció d'IL-1 β per part de l'endoteli (Geu, 2004).

En disminuir-se el nombre de cèl.lules β hauria de disminuir l'expressió de VEGF, ja que el transgèn s'expressa sota el control del promotor del gen de la insulina 1 (RIP-1). No obstant, durant els processos inflamatoris, té lloc un increment en la producció de VEGF (Schmid-Schönbein, 2006). Així, després d'una lligació ductal, la pancreatitis que en resulta dona lloc a una important infiltració de macròfags en el pàncrees i, aquests secreten nivells alts de VEGF (Rooman, 1997). Per tant, una vegada iniciada la resposta inflamatòria, aquesta podria mantenir-se encara que disminuís el nombre de cèl.lules que expressaven el transgèn, gràcies a la producció de VEGF i citocines per part dels macròfags infiltrants (Mackay, 2001).

La infiltració de macròfags i la sobreproducció de VEGF i citocines com MCP-1, es podrien considerar característiques d'una inflamació o immunitat innata, que és un tipus de resposta immune no específica contra uns antígens determinats (Schmid-Schönbein, 2006). No obstant, en els pàncrees dels animals Tg VEGF 1 als 8 mesos, s'observava només una pèrdua de massa de cèl.lula β , ja que en la doble tinció contra insulina i glucagó, les cèl.lules α no semblaven menys abundants que en els controls. Per tant, el procés inflamatori i fibròtic semblava danyar principalment les cèl.lules β . La mort selectiva de les cèl.lules β podia ser explicada per una major susceptibilitat d'aquestes cèl.lules enfront de la inflamació o bé, pel desenvolupament progressiu d'una resposta específica contra elles.

Les cèl.lules β són especialment sensibles a l'òxid nítric (NO) i als radicals lliures, els quals són secretats abundantment pels macròfags durant els processos inflamatoris (Schmid-Schönbein, 2006). La causa és, principalment, que les cèl.lules β expressen a nivells molt baixos els enzims protectors contra els radicals lliures, com la superòxid dismutasa o la catalasa (Laybutt, 2002; Sandtröm, 2002). Per tant, les cèl.lules β dels animals Tg VEGF 1, que es trobaven sotmeses a una inflamació crònica, podien morir degut a aquesta susceptibilitat.

Per altra banda, s'hauria de considerar la possibilitat d'un atac específic contra els illots, ja que una resposta innata, quan l'estímul es perllonga, acaba desevocant en una resposta específica contra les cèl.lules que indueixen la resposta immune. La immunitat adaptativa es caracteritza per la presència d'un important infiltrat de limfòcits i cèl.lules plasmàtiques, però també de macròfags (Abbas, 2000). Així, els macròfags intervenen tant en la resposta innata com en l'adaptativa i indueixen la transició de l'una a l'altra. Per fer-ho, els macròfags secreten diverses citoquines que atreuen als limfòcits, els quals van cap al lloc de la inflamació (Celletti, 2001). Una vegada hi arriben, s'activen en contactar amb diferents antígens, donant lloc a la resposta immune específica. En el cas de la diabetis tipus 1, els macròfags són el primer tipus de cèl.lula immune que infiltra els illots pancreàtics, on hi secreten diferents citoquines pro-inflamatòries (IL-1 β , TNF- α , etc.) que atreuen als limfòcits (André-Schutz, 1999; Mensah-Brown, 2006). A més, hi actuen com a cèl.lules presentadores professionals (APCs). Així, en els pàncrees dels transgènics VEGF 1, els macròfags infiltrants (que es detectaven ja als 5 mesos d'edat) o les pròpies cèl.lules endotelials podien presentar antígens als limfòcits reclutats per les citoquines, de manera que es podria induir una resposta específica contra les cèl.lules β . Els limfòcits T detectats mitjançant FACS probablement van ser atrets per IL-1 β , TNF- α (Higuchi, 1992; Picarella, 1993; Abbas, 2000; Schmid-Schönbein, 2006) els limfòcits B debien ser atrets per IL-6 (Campbell, 1994). Per tant, la inflamació crònica dels pàncrees transgènics podia donar lloc a la mort de cèl.lules β (per ser més susceptibles) i això podia permetre la presentació dels seus antígens als limfòcits i donar lloc a un atac autoimmune específic contra elles. Així, s'establiria una relació entre una inflamació inespecífica i un atac autoimmune contra les cèl.lules β (Pietropaolo, 2007). No obstant, caldria la detecció d'auto-anticossos i limfòcits T autoreactius per confirmar aquesta possibilitat.

A més, el propi VEGF també podria col.laborar en l'evolució cap a una resposta adaptativa, ja que experiments *in vitro* suggereixen que els limfòcits T poden expressar VEGFR-2 i, que, VEGF indueix l'expressió de citoquines Th1 per part d'aquests limfòcits T. Així, segons els autors, un dany tissular indueix VEGF i aquest atreu limfòcits T que produeixen una resposta adaptativa de tipus Th1 (Watanabe, 2004).

Durant l'atac immune contra els illots que té lloc en el desenvolupament de diabetis, les cèl.lules endotelials s'activen i regulen la infiltració de les cèl.lules mononuclears, ja que l'activació de l'endoteli permet el reconeixement de limfòcits i macròfags i el seu extravassament cap a l'illot mitjançant molècules d'adhesió com I-CAM (Camacho, 2001). Així,

la supressió d'I-CAM als vasos insulars dels NOD disminueix la susceptibilitat a desenvolupar diabetis (Balasa, 2000). A més, tant un increment en TNF- α com en IL-1 β activa l'expressió d'I-CAM-1 a l'endoteli dels illots (Picarella, 1993; Papaccio, 2002). VEGF pot activar les cèl.lules endotelials i induïx l'extravassació de leucòcits mitjançant un increment de la permeabilitat vascular (Carmeliet, 2000). Per tant, a l'endoteli del pàncrees endocrí dels animals Tg VEGF 1 podria donar-se un increment en l'expressió d'I-CAM, juntament a una facilitació de l'extravassació de leucòcits mediada per VEGF.

Amb l'objectiu d'estudiar el paper de diferents citoquines en el desenvolupament de diabetis, s'han generat models de ratolins transgènics que sobreexpressen aquestes citoquines en els illots pancreàtics. Els ratolins que sobreexpressen TNF- α a les cèl.lules β (RIP/TNF- α) desenvolupen insulitis, sense diabetis, demostrant que la infiltració *per se* no és diabetogènica (Higuchi, 1992; Picarella, 1993). Els animals que sobreexpressen MCP-1 (RIP/MCP-1) presenten un infiltrat bàsicament constituït per macròfags amb alguns limfòcits i, tampoc desenvolupen diabetis (Grewal, 1997). Aquests models demostren que les citoquines TNF- α i MCP-1, encara que estan implicades en el procés diabètic, no induïxen la malaltia per sí soles. En canvi, la sobreexpressió de VEGF, en els animals Tg VEGF 1, era capaç d'orquestrar una inflamació amb l'expressió de diverses citoquines, incloent TNF- α i MCP-1 i, conduïa, així, a la destrucció dels illots i a diabetis oberta. A més de l'increment en un conjunt de citoquines pro-inflamatòries, els ratolins Tg VEGF 1 desenvolupaven fibrosi i aquesta podia incrementar la toxicitat contra les cèl.lules β . Per contra, els animals transgènics que expressen IL-6 a les cèl.lules β (RIP/IL-6) també mostren textit fibròtic envaint els illots i insulitis, predominantment de limfòcits B, i tampoc esdevenen diabètics (Campbell, 1994). Per tant, aquests resultats suggeririen que és el conjunt de les citoquines pro-inflamatòries, la infiltració crònica i el procés fibròtic el que portava a la pèrdua de la massa de cèl.lula β en els ratolins Tg VEGF 1.

Contràriament als animals Tg VEGF 1, els ratolins Tg VEGF 2 mantenien una homeòstasi de la glucosa normal i no desenvolupaven diabetis oberta. Només a partir de l'edat de dotze mesos eren intolerants a la glucosa i lleugerament hiperglucèmics i hipoinsulinèmics respecte els controls de la mateixa edat. Després d'un estudi morfològic, es va observar que la distribució de les cèl.lules α - β i la vascularització dels illots, estava alterada de forma similar a com ho estava en els mateixos animals als dos mesos. Per tant, en aquest cas, igual que els Tg VEGF 1 als cinc mesos, tampoc es podria relacionar la disfunció dels illots amb la seva desorganització.

En els rossegadors s'ha descrit que, amb l'edat, té lloc un increment en la massa de cèl.lula β per tal de compensar la creixent demanda d'insulina. Sembla que aquest augment en la massa de cèl.lula β tindria lloc per proliferació de les cèl.lules β pre-existents, ja que no incrementa el nombre d'illots, sinó el tamany d'aquests (Montanya, 2002). Aquesta hiperplàsia dels illots descrita per altres grups es va determinar també en els ratolins controls d'un any, que presentaven un augment de gairebé el 50% de la massa respecte els controls de dos mesos. En canvi, la massa de cèl.lula β dels animals Tg VEGF 2 no variava entre els dos i els dotze mesos. Mitjançant el comptatge de cèl.lules β en apoptosi i en replicació es va observar que els illots dels animals VEGF 2 d'un any mostraven una disminució en la proliferació de les cèl.lules β respecte els controls de la mateixa edat. Aquesta disminució, però, no es va trobar en els mateixos animals als dos mesos. No obstant, contràriament al que s'havia descrit a la bibliografia (Teta, 2005), l'índex de replicació de les cèl.lules beta en els animals controls vells no era més baix que en els joves, només ho era en els Tg VEGF 2. La disminució de la massa de cèl.lula β en els Tg VEGF 2 vells respecte els controls podria ser compensada per una major secreció d'insulina per cèl.lula β , però aquesta compensació no fou observada.

Els ratolins amb el gen VEGF inactivat específicament a les cèl.lules β presenten una massa de cèl.lula β normal, però una disminució en la secreció d'insulina, que no és deguda a una disfunció pròpia de la cèl.lula β , sinó a una deficient funció vascular (Lammert, 2003b; Brissova, 2006). Per contra, els ratolins transgènics VEGF 1 als 5 mesos i els de la 2 als 12 mesos mostraven una desestructuració en la microcirculació dels illots similar a la dels mateixos animals joves quan no eren intolerants a la glucosa. Per tant, la disfunció dels illots difícilment podia ser deguda a alteracions en la vascularització.

A la mateixa edat en que els Tg VEGF 2 presentaven una disminució en la secreció d'insulina, es van detectar macròfags infiltrants en els seus illots. Aquest resultat va ser similar al que es va obtenir en els ratolins Tg VEGF 1 als cinc mesos, que també mostraven alteracions en la secreció i insulitis amb macròfags. En canvi, els animals joves de dos mesos no mostraven disminució de la funcionalitat de les cèl.lules β ni tampoc inflamació del pàncrees endocrí o, com a mínim, no a nivells que poguéssim detectar. Per tant, una possible explicació de la disfunció dels illots en animals més vells, podria ser aquest procés inflamatori.

El fet que no es va detectar una resposta inflamatòria en el pàncrees endocrí dels animals RIP-I/VEGF quan eren joves ens podia indicar que aquest procés inflamatori era gradual i

incrementava exponencialment amb l'edat dels animals. A més, la virulència d'aquesta inflamació també augmentava segons el nivell d'expressió del transgèn. D'aquesta manera, els Tg VEGF 1, amb una major expressió de VEGF, desenvolupaven una inflamació més ràpida i greu. L'empitjorament del procés inflamatori al llarg del temps, possiblement, era conseqüència d'una retro-alimentació positiva. Així, el VEGF activava la infiltració de macròfags i la secreció de citocines i, llavors tot això donava la producció d'altres citocines i el reclutament de més leucòcits, en una cascada que amplificava la resposta immune. A més, cal tenir present, que el promotor RIP-I es regula igual que la insulina. Una major demanda d'insulina deguda a l'edat requeriria un increment en l'expressió de l'hormona (Bonner-Weir, 2001) i, per tant, amb l'edat també es podria donar una major expressió de VEGF. També, les alteracions morfològiques dels illots podien permetre petits increments en la glucosa sèrica, que en animals joves no donarien diferències significatives respecte els controls, però que, progressivament, podrien augmentar l'expressió del transgèn. Així, la desorganització o una acumulació excessiva de col·lagen als capil·lars podria dificultar l'accés de la insulina al torrent sanguini i, lentament incrementar la glucosa circulant. Llavors, els nivells lleugerament més alts de glucosa incrementarien l'expressió de VEGF, i aquest, agreujaria les alteracions dels illots i, aquestes, al seu torn, donarien una major glucèmia. Així, successivament, s'afavoriria l'entrada en un procés exponencial fins a donar intolerància a la glucosa i una lleugera hiperglucèmia en els animals Tg VEGF 2 o d'una hiperglucèmia diabètica en els Tg VEGF 1.

La resposta inflamatòria es donava en els animals VEGF 2 quan ja eren vells. No obstant, la citocina IL-6 ja estava incrementada en els transgènics de dos mesos. Probablement, aquest augment era degut a l'efecte directe de VEGF i no requeria de la resta de factors pro-inflamatoris, de manera que apareixia abans. Encara que s'expressaven nivells més alts d'IL-6, els ratolins de VEGF 2 joves no desenvolupaven intolerància a la glucosa. Potser caldria la presència d'un conjunt de citocines i, no només IL-6, per alterar la funcionalitat dels illots. A més, la diabetis tipus 1 és el resultat d'una resposta immune de tipus Th1, i s'ha demostrat que algunes citocines Th2 (com IL-10) poden protegir del desenvolupament de diabetis a ratolins NOD (Balasa, 2000) o poden millorar la funcionalitat dels illots *in vitro* exposats a citocines Th1 (Marselli, 2001). Així, les citocines Th1 (TNF- α , IL-1 β) són les principals responsables de la disfunció del pàncrees endocrí prèvia a la diabetis oberta (Park, 1999, Papaccio, 2002). Per contra, IL-6 és una citocina de tipus Th2, de manera que, possiblement, no pugui induir alteracions a les cèl·lules β capaces de disminuir la secreció d'insulina.

Per altra banda, les cèl·lules de Schwann de la càpsula que envolta els illots s'han relacionat amb l'atac autoimmunitat i la disfunció dels illots que té lloc en la diabetis tipus 1. S'ha detectat la presència de les cèl·lules de Schwann en els infiltrats dels ratolins NOD i també s'han detectat auto-anticossos contra les cèl·lules de Schwann (Burris, 2007). Fins i tot, s'ha descrit que determinades proteïnes d'origen neuronal o glial podrien actuar com a desencadenants de l'atac autoimmunitat contra les cèl·lules β (Winer, 2003). S'han trobat limfòcits B productors contra aquestes proteïnes (principalment GFAP) en infiltrats d'illots del model animal de diabetis tipus 1, els ratolins NOD (Carrillo, 2005). Així doncs, un major nombre de cèl·lules de Schwann al pàncrees endocrí dels ratolins transgènics podria col·laborar en el desenvolupament d'infiltració i, consegüentment, donar intolerància a la glucosa (Tg VEGF 2) i, a llarg termini, diabetis (Tg VEGF 1). No obstant, l'augment en el marcatge de GFAP s'observava ja als dos mesos i per igual a les dues línies, de manera que la participació d'aquestes cèl·lules en la inflamació dels illots transgènics podria ser poc important (o molt tardana).

Algunes citocines detectades en models animals de diabetis, s'ha demostrat que a més de mediar l'atac immune, també disminueixen directament la secreció d'insulina en illots en cultiu (Chen, 2001; Piemonti, 2002; Kutlu, 2003). Així, citocines com IL-1 β , TNF- α i MCP-1 exerceixen un efecte tòxic sobre les cèl·lules β i alteren la funció dels illots (Park, 1999). Alguns d'aquests estudis demostren que la deficiència en la secreció d'insulina deguda a aquestes citocines és deguda a la disminució de Pdx-1 i GLUT-2 (Ling, Z, 2000). Així, en els animals transgènics d'ambdues línies, els macròfags i altres leucòcits, juntament a l'endoteli dels illots, produïen diverses citocines pro-inflamatòries, i aquestes podien ser les responsables de l'alteració en la funcionalitat de les cèl·lules β .

Primerament, es va determinar l'expressió dels gens implicats en la captació de la glucosa, que és el primer pas en el procés de secreció de la insulina. Aquests gens són el transportador de glucosa GLUT-2 i l'enzim glucoquinasa (GK), que constitueixen l'anomenat *sensor de la glucosa* (Bell, 2001; Pickup & Williams, 2003). Els ratolins VEGF de la línia 2 als 12 mesos presentaven una reducció important de l'expressió de GLUT-2, i de GK. Similarment, s'ha descrit que els ratolins *knock-out* per GLUT-2, desenvolupen també una disminució en la captació de glucosa i, per tant, en la secreció d'insulina (Valera, 1994; Guillam, 1997). La supressió de l'expressió de GK a les cèl·lules β també disminueix la secreció d'insulina (Terauchi, 1995; Grupe, 1995). De fet, la pèrdua d'activitat glucoquinasa dona lloc a un tipus de

diabetis no autoimmune anomenada MODY 2 (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*) (Froguel, 1993; Froguel & Velho, 1999).

Diferents models de diabetis tipus 1, presenten una disminució en l'expressió de GLUT-2, com les rates BB (Johnson, 1990; Orci, 1990) o els ratolins NOD. En aquest model murí de diabetis tipus 1, s'ha detectat aquesta deficiència en GLUT-2, en moments previs a l'aparició de diabetis oberta i coincidint amb la insulitis. Les zones dels illots que estan infiltrades, presenten cèl.lules que no expressen GLUT-2 però sí insulina (mitjançant tincions immunohistoquímiques). En aquests estudis en ratolins NOD, els autors descriuen que les cèl.lules immunes infiltrants (macròfags i limfòcits T) secreten citoquines i radicals lliures, els quals disminueixen l'expressió de Pdx-1 i GLUT-2 a les cèl.lules β adjacents i això porta a una deficient secreció d'insulina i intolerància a la glucosa abans del desenvolupament d'hiperglucèmia diabètica (Reddy, 1998). Aquest resultat estaria d'acord amb la detecció de cèl.lules positives per insulina però no per GLUT-2 en els illots dels animals transgènics VEGF 2 quan estaven infiltrats amb macròfags.

De manera similar, la disminució en l'expressió de GLUT-2 també precedeix el desenvolupament de diabetis oberta en diversos models de diabetis tipus 2, com per exemple els ratolins db/db (Thorens, 1992), les rates ZDF (Orci, 1990; Johnson, 1990), les rates GK (Orci, 1990) o els ratolins NZO (Chankiewicz, 2006). També estudis *in vitro* amb illots de pacients humans de diabetis tipus 2 mostren una secreció d'insulina en resposta a glucosa disminuïda que es relaciona amb deficiències en GLUT-2 (Deng, 2004). La disminució de l'expressió de GLUT-2 seria doncs, una característica comuna entre els individus amb diabetis tipus 1 i tipus 2, i a la vegada, suposaria una possible alteració que podria agreujar el procés diabètic tipus 2, donat que impediria a les cèl.lules β incrementar la secreció de manera suficient com per compensar la resistència a la insulina (Orci, 1990).

També es va observar una marcada disminució del factor de transcripció Pdx-1 en els illots dels animals Tg VEGF 2 als 12 mesos d'edat, mentre que no es van trobar diferències en els animals joves. El factor de transcripció Pdx-1 actua regulant la transcripció de diferents gens i d'entre ells cal destacar GLUT-2 (Waeber, 1996) i la glucoquinasa (Watada, 1996). La disminució de Pdx1 podria, doncs, estar relacionada amb la disminució de l'expressió de GLUT-2 i de GK, observades en els ratolins VEGF en el moment de ser intolerants. Així, els ratolins deficients per Pdx1, en heterozigosi (Pdx1^{+/-}), presenten una marcada disminució en la secreció

d'insulina en resposta a glucosa, que s'ha relacionat amb una disminució dels nivells de GLUT-2, juntament a l'alteració en altres gens implicats en la cadena respiratòria o la mobilització de Ca^{2+} intracel·lular (Jonsson, 1994; Offield, 1996; Brissova, 2002; Gauthier, 2004).

Per altra banda, una pèrdua de Pdx-1 resulta en una menor proliferació i supervivència de les cèl·lules β , donant una menor massa de cèl·lula β (Accili, 2004; Babu, 2007). Així doncs, la disminució de la proliferació de les cèl·lules β en els animals Tg VEGF 2 vells podia ser deguda, probablement, a una baixada dels nivells de Pdx-1.

L'expressió del gen de Pdx1 ve regulada per la interacció de diferents factors de transcripció, com són per exemple HNF3 β (Ben-Shushan, 2001; Lee, 2002; Samara, 2002). En illots dels ratolins transgènics VEGF 2, en el moment en que eren intolerants a la glucosa, s'havia observat una disminució significativa dels nivells d'expressió de HNF3 β . Aquesta disminució podria ser responsable de la reducció de Pdx1 en els illots dels mateixos ratolins. Per altra banda, s'ha descrit que ratolins heterozigots doble *knock-out* per Pdx1 i HNF3 β (Pdx1^{+/-}/Hnf3 β ^{+/-}) presenten una intolerància a la glucosa amb una deficiència en la secreció d'insulina més marcada que els ratolins Pdx1^{+/-} (Shih, 2002). Per tant, la deficiència en HNF3 β en els illots VEGF 2 podria donar altres alteracions diferents de les induïdes per Pdx-1. Així, el factor de transcripció HNF3 β regula també la transcripció d'altres gens importants en la funció de la cèl·lula β com HNF4 α , HNF1 α , Nkx6.1 i MafA (Wilson, 2003; Raum, 2006), i les subunitats Kir6.2 i SUR1 dels canals de potassi dependents d'ATP (Sund, 2001; Lantz, 2004). De manera que la disminució en la funció dels illots VEGF 2 podria també ser deguda a una deficient expressió d'aquests gens i no només a una manca de GLUT-2 i GK.

En resum, els ratolins transgènics RIP-I/VEGF de la línia 2 a l'edat d'un any presentaven una inflamació crònica que donava una sèrie d'alteracions en les cèl·lules β , similars a les que es podrien trobar en alguns individus susceptibles a desenvolupar diabetis (Unger, 1991; Brissova, 2002; Kulkarni & Kahn, 2004). Per tant, aquests animals mostraven un estat pre-diabètic, caracteritzat per una menor expressió de gens clau en la funció dels illots, per una producció de citokines i una disminució de la secreció d'insulina. Per la seva banda, els animals Tg VEGF 1 desenvolupaven també un procés inflamatori però que resultava més ràpid i agressiu donant lloc, primerament, a una disfunció del pàncrees endocrí i desenvocant, finalment, en diabetis oberta.

Per tal de comprovar si les alteracions descrites en els animals VEGF 2, podrien fer-los molt

més vulnerables a desenvolupar diabetis oberta enfront d'un factor accelerador, vam tractar els animals a l'edat de dos mesos amb dosis de STZ que no fossin diabetogèniques pels controls. S'ha descrit que els ratolins control tractats amb dosis molt baixes de STZ (5 x 20 mg/Kg) són capaços de mantenir la normoglucèmia, i no arriben a desenvolupar diabetis després d'aquest tractament, conegut com a *MVLD STZ* (Casellas, 2006). Els ratolins RIP-I/IGF-II, generats en el nostre laboratori, presenten illots desorganitzats, amb un increment en l'expressió de col.làgens, alteracions que també es van observar en els animals VEGF 2, i són més susceptibles a desenvolupar diabetis oberta en resposta a aquest tractament (tesi doctoral Salavert, 2007). En canvi, els ratolins transgènics VEGF 2 tractats no esdevenien diabètics oberts. No obstant, sí eren intolerants a la glucosa, a una edat en que els mateixos transgènics no tractats encara no ho eren. A més, aquests animals tractats mostraven també infiltració de macròfags. Per tant, el tractament amb STZ accelerava el desenvolupament del procés inflmatori i la disfunció dels illots.

Aquesta acceleració pel tractament amb la STZ podia ser deguda a diferents causes. Per una banda, l'increment en la vascularització dels illots juntament a la capacitat de VEGF d'augmentar la permeabilitat dels vasos podria haver afavorit l'accés de STZ a les cèl.lules β . Per altra banda, la desorganització en la morfologia dels illots i de la càpsula de cèl.lules de Schwann podria fer-los més vulnerables a la STZ i permetre que les cèl.lules β fossin més accessibles a l'atac del sistema immunitari.

Les cèl.lules β es troben adjacents a l'endoteli dels vasos de l'illot ja que requereixen de l'ECM dels capil.lars. Aquesta ECM indueix determinades senyals que estimulen la síntesi d'insulina i la proliferació i supervivència de les cèl.lules β (Nikolova, 2006; Nikolova, 2007). S'ha descrit que aquestes senyals poden venir donades per la laminina (Nikolova, 2006; Nikolova, 2007). No obstant, els nostres estudis amb els ratolins VEGF demostraven un efecte tòxic de l'excés de col.lagen IV en els ratolins Tg VEGF 1. A més, aquesta matriu no podia incrementar la secreció d'insulina en els animals Tg VEGF 2 a l'edat d'un any o després del tractament amb STZ. Això estaria d'acord amb estudis *in vitro* que demostren que el cultiu d'illots humans amb col.lagen IV disminueix la capacitat de secreció d'insulina (Kaido, 2006).

Actualment, una de les teràpies experimentals per la diabetis tipus 1 és el transplantament d'illots. No obstant, calen els illots de diversos donants pel transplantament d'un sol pacient i aquesta n'és la principal limitació (Montanya, 2001; Ricordi, 2003). Així doncs, s'estan dirigint molts esforços per aconseguir incrementar la supervivència dels illots després del transplant, per

tal de disminuir-ne el nombre necessari. Un dels factors clau en la supervivència de l'empelt és la capacitat de re-vascularització dels illots, ja que un cop transplantats, degut a la hipòxia i les reaccions inflamàtores, més del 50% dels illots moren (Ricordi, 2003). Durant el procés d'aïllament i purificació dels illots pancreàtics, gran part de les cèl.lules endotelials es perden. Estudis recents, han demostrat que la vascularització que es forma *de novo* en els illots transplants creix a partir de la proliferació de les cèl.lules endotelials dels propis illots del donant (Brissova, 2004). Així doncs, s'estan desenvolupant aproximacions de teràpia gènica per incrementar la capacitat neogènica dels illots un cop transplantats. Així, s'ha demostrat que illots murins transduïts amb adenovirus que expressen VEGF presenten una revascularització i una supervivència millorada després del transplantament (Chen, 2004). En altres estudis s'ha observat que tant illots de ratolí, rata com humans, tractats amb VEGF o que l'expressen, presenten augmentada la proliferació de les cèl.lules endotelials després del transplantament i això incrementa la supervivència i la funcionalitat de les cèl.lules β (Lee, 1997; Chae, 2005; Gang, 2006; Linn, 2006). Fins i tot, s'ha relacionat la pèrdua dels illots en el protocol de transplantament Edmonton amb l'ús de l'immunosupressor Rapamicina, i amb l'efecte negatiu d'aquest agent sobre la producció de VEGF per part dels illots (Cross, 2007).

No obstant, no s'han realitzat estudis a llarg termini de l'efecte de la sobreexpressió de VEGF en els illots transplantats. Els ratolins RIP-I/VEGF presentaven inflamació a partir del cinquè mes de vida o d'un any, depenent del nivell d'expressió. Aquesta inflamació crònica donava disfunció del pàncrees endocrí o diabetis oberta. Similarment a aquest resultat, els illots transplantats que expressen VEGF podrien incrementar en un primer moment la supervivència gràcies a una millor revascularització, però amb el temps, podrien desenvolupar inflamació i portar a la mort de les cèl.lules β . Per tant, els resultat obtinguts amb els ratolins transgènics VEGF suggeririen un possible efecte negatiu de l'ús de teràpia gènica per expressar VEGF en illots transplantats.

Per altra banda, els nostres estudis podrien relacionar processos descontrolats d'angiogènesi en els illots amb una disminució en la funcionalitat i en la viabilitat de la cèl.lula β . La massa de cèl.lula β no és estàtica, sinó que varia d'acord a les necessitats de secreció d'insulina (Bonner-Weir, 2001). Per tal de compensar una resistència a la insulina, ha de tenir lloc un increment de la massa de cèl.lula β i, aquest augment, ha d'anar acompanyat d'un procés d'angiogènesi, que formi els capil.lars que han d'irrigar les noves cèl.lules de l'illot (Ballian, 2007). De fet, sembla que aquest procés seria el que té lloc en els animals amb els dos gens de la

insulina inactivats a les cèl.lules β , que presenten illots més grans amb un increment en el nombre de vasos (Duvillié, 2002). Per contra, els ratolins fills de mares sotmeses a una dieta deficient en proteïnes presenten una disminució en la vascularització dels illots juntament a un menor tamany d'aquests (Dahri, 1991). També, s'ha descrit que la deficient formació de vasos és una de les causes que porta a la disfunció dels illots a les rates Zucker. En aquests animals, té lloc una hiperplàsia dels illots per compensar els requeriments d'insulina, però sense una angiogènesi suficient (Li, 2006). També s'ha observat un increment en la producció de matriu extracel.lular amb una major expressió de MMPs, fibrosi, vasos alterats i inflamació en els illots en les rates GK (Homo-Delarche, 2006). En aquests animals, s'ha relacionat les alteracions en la vascularització, la fibrosi i la inflamació amb la disminució en la secreció d'insulina.

Per tant, si un major requeriment d'insulina promou un creixement de la massa de cèl.lula β (Bonner-Weir, 2001), seria d'esperar una major expressió de VEGF en els illots mentre aquests pateixen un procés d'hiperplàsia; com pot succeir en animals obesos, resistents a la insulina o durant l'embaràs (Brissova, 2006; Johansson, 2007). En condicions fisiològiques, aquest VEGF donaria la formació correcta de vasos, permetent l'expansió de la massa de cèl.lula β en funció dels requeriments d'insulina. No obstant, si la demanda de l'hormona continua incrementant, la sobreexpressió descontrolada de VEGF podria donar lloc a alteracions en la microcirculació dels illots, a una desorganització de l'ECM i a una inflamació, que, finalment, desenvocaria en una menor funcionalitat dels illots o en diabetis oberta.

Així doncs, les cèl.lules endotelials i la seva matriu extracel.lular podrien estar implicades en l'activació de respostes inflamatòries i alteracions morfològiques i funcionals en els illots pancreàtics. D'aquesta manera, alteracions a l'endoteli vascular no serien només conseqüència de la disfunció del pàncrees endocrí o de la diabetis, sinó que podria ser-ne part de la causa.

VI. CONCLUSIONS

PART I: ESTUDI DELS MECANISMES PELS QUALS IGF-I INDUEIX LA REGENERACIÓ DEL PÀNCREES ENDOCRÍ.

- 1) La sobreexpressió d'IGF-I en els illots dels ratolins transgènics RIP-I/IGF-I era capaç de revertir el procés diabètic després del tractament amb estreptozotocina (STZ). La recuperació de la massa de cèl.lula β era deguda principalment a una major taxa de replicació de les cèl.lules β .
- 2) Els illots dels ratolins transgènics IGF-I presentaven una major activació de la via de l'IGF-IR, amb un increment en P-Akt i P-FoxO1. Conseqüentment, disminuïen els nivells nuclears de p27 i incrementava la Cdk-4 nuclear a les cèl.lules β , suggerint una predisposició d'aquestes cèl.lules a replicar.
- 3) No obstant, s'observava que els illots dels ratolins transgènics IGF-I presentaven un increment de p21, mentre l'expressió de les ciclines D1 i D2 no augmentaven. Així, IGF-I activava només parcialment la maquinària de control del cicle cel.lular i evitava una sobreproliferació de les cèl.lules β .
- 4) Després del tractament amb STZ, els illots dels ratolins transgènics IGF-I mantenien l'increment de Cdk-4 nuclear i, augmentaven la ciclina D1, amb una normalització de p21. Aquests resultats podrien explicar l'augment en la replicació de les cèl.lules β després del tractament amb STZ.
- 5) Els illots IGF-I presentaven un increment del factor pro-angiogènic VEGF però també del factor anti-angiogènic PEDF. Per tant, això portava a un manteniment de la vascularització dels illots de forma similar que als animals controls.
- 6) Els nostres resultats, suggerien que l'expressió d'IGF-I als illots pancreàtics podria ser una aproximació terapèutica per la regeneració del pàncrees endocrí *in vivo* durant el procés diabètic.

PART II: ESTUDI DEL PAPER DEL VEGF I DE L'ENDOTELI VASCULAR EN LA FUNCIO I VIABILITAT DEL PANCREES ENDOCRÍ.

- 1) Es van obtenir dues línies de ratolins transgènics que sobreexpressaven VEGF a les cèl·lules β pancreàtiques (RIP-I/VEGF): la línia VEGF 1, amb elevada expressió, i la línia VEGF 2, d'expressió moderada.
- 2) La sobreexpressió de VEGF en els ratolins Tg VEGF 1 i 2 portava a un increment de la vascularització del pàncrees endocrí, un engruiximent de la membrana basal d'aquests capil·lars i, una alteració de la distribució cel·lular dels illots.
- 3) La sobreexpressió de VEGF en els ratolins Tg VEGF 1 i 2 joves, no alterava la massa de cèl·lula β , la tolerància a la glucosa, ni la secreció d'insulina respecte els ratolins controls.
- 4) Els ratolins Tg VEGF 1 presentaven una important pèrdua de massa de cèl·lula β associada a un procés inflamatori en els illots, amb expressió de citoquines i infiltració de macròfags, limfòcits i altres leucòcits. Això feia que, amb l'edat, desenvolupessin intolerància a la glucosa i, posteriorment, diabetis oberta.
- 5) Els ratolins Tg VEGF 2 es mantenien normoglicèmics, però, amb l'edat, esdevenien intolerants a la glucosa. Presentaven una lleugera disminució de la massa de cèl·lula β deguda, probablement, a una menor taxa de replicació. Així, aquests animals desenvolupaven un estat pre-diabètic.
- 6) El pàncrees endocrí dels ratolins Tg VEGF 2 vells presentava també una inflamació amb l'expressió de citoquines i una infiltració de macròfags. Aquest procés inflamatori seria probablement la causa de la disminució en l'expressió de GLUT-2, GK, Pdx1 i HNF3 β als illots i de l'alteració en la secreció d'insulina.
- 7) El tractament amb dosis molt baixes d'estreptozotocina en els ratolins Tg VEGF 2 joves accelerava l'aparició de la inflamació en els illots i la intolerància a la glucosa.
- 8) Tots els resultats anteriors suggereixen que una sobreproducció de VEGF als illots pot portar a una disfunció dels illots i, fins i tot, al desenvolupament de diabetis oberta, possiblement, a través de l'activació de respostes inflamatòries en els pàncrees endocrí.

VII. MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS

1.1. Animals

Els animals RIP-I/IGF-I utilitzats en aquest estudi procedeixen d'una colònia prèviament establerta i caracteritzada en el nostre laboratori (George, 2002). Els ratolins RIP-I/VEGF es van generar de nou per a la realització d'aquest treball. Ambdues colònies es van generar a partir d'híbrids C57BL/6;SJL (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA). Tots els animals estaven alimentats *ad libitum*, és a dir, sense restringir-los l'accés al menjar, amb una dieta estàndar (2018S Teklad Global, Harlan Teklad, Madison, Wisconsin, EEUU) i es van mantenir en condicions de temperatura i llum controlades (cicles de 12 hores de llum i 12 hores de foscor). Quan va ser necessari, els animals es van dejunar durant 16 hores a la nit. Per l'eutanàsia, els animals es van anestesiar mitjançant anestèsics inhaladors (Isoflurano, IsoFlo[®], Abbott Animal Health, Illinois, EEUU) i es van decapitar. Tots els procediments experimentals van ser aprovats pel Comitè d'Ètica i d'Experimentació Animal i Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona.

1.2. Reactius

Els reactius de biologia molecular es van obtenir de les cases comercials Roche (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN, EEUU), Invitrogen Corporation (San Diego, CA, EEUU), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EEUU), Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EEUU), Sigma (St.Louis, MO, EEUU) i Promega Corporation (Madison, WI, EEUU). Els productes marcats radioactivament [α -³²P]dCTP es van adquirir a Amersham Biosciences. L'estreptozotocina (ref. S-0130) es va adquirir de Sigma (St.Louis, MO, EEUU).

1.3. Sondes de DNA

Les sondes utilitzades per detectar la incorporació del transgèn mitjançant *Southern blot*, així com la seva expressió en el cas del VEGF, mitjançant *Northern-blot* van ser les següents:

- sonda IGF-I: fragment de 790 pb corresponent al cDNA de l'IGF-I murí. Es va obtenir de la digestió del plàsmid pBS-RIP-I/IGF-I amb l'enzim de restricció *EcoRI*.
- sonda VEGF: fragment de 623 pb corresponent al cDNA de la isoforma 164 del VEGF murí. Es va obtenir de la digestió del plàsmid pBS-RIP-I/VEGF amb l'enzim de restricció *EcoRI*.

1.4. Anticossos

Els anticossos utilitzats per la realització de les tincions immunohistoquímiques i de les anàlisis de l'expressió de proteïnes per Western blots van ser els següents:

- anticòs de conill porcí contra insulina porcina (I-8510) – Sigma Chemical Co., Saint Louis, Missouri, EEUU.
- anticòs de conill contra IGF-I – GroPep Pty. Ltd., North Adelaide, Australia.
- anticòs de cabra contra VEGF (ab9953) – Abcam, Cambridge, UK
- anticòs de cabra contra PEDF- R&D Systems
- anticòs de conill contra glucagó (64701) – INC Biochemicals Inc., Aurora, OH, EEUU.
- anticòs de conill contra GLUT-2 (AB1342) – Chemicon International Inc., CA, EEUU.
- anticòs de conill contra E-cadherina (sc-7870) – Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EEUU.
- anticòs de conill contra Col·lagen IV – Chemicon International, Inc USA.
- anticòs de conill contra GFAP (Z 0334) - DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, DK.
- anticòs de ratolí contra p27-BD Transduction Laboratories, BD Bioscience Pharmingen, San Jose, CA, EEUU.
- anticòs de conill contra iNOS de ratolí (ab 3523)- Abcam, Cambridge Science Park, UK
- anticòs Phospho-FoxO1 (Ser256) (9461) Cell Signalling Technology, Inc.
- anticòs FoxO1(9462) Cell Signalling Technology, Inc.
- anticòs Phospho-Akt (Ser473) (9271) Cell Signalling Technology, Inc.
- anticòs Akt (9272)- Cell Signalling Technology, Inc.
- anticòs de rata contra F4/80 (BM4008S) – Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Germany
- anticòs de ratolí contra CD11c (553802) - BD Bioscience Pharmingen, San Jose, CA, EEUU
- anticòs de rata contra CD11b (ab6332) – Abcam, Cambridge Science Park, UK
- anticòs de rata contra CD19 (115507) – BioLegend, San Diego, CA, EEUU
- anticòs de ratolí contra CD4 (10004599) – Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EEUU
- anticòs de ratolí contra CD8 (10004715) -Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EEUU
- anticòs de ratolí contra Ki67 (55609) – BD Bioscience Pharmingen, San Jose, CA, EEUU.
- anticòs de rata contra CD45 (550539) – BD Bioscience Pharmingen, San Jose, CA, EEUU.
- anticòs de conill contra CDK4 – Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EEUU.
- anticòs de conill contra ciclina D1 (RM-9104) – Thermo Fisher Scientific, Anatomical Pathology, Fremont, CA, EEUU

- anticòs de cabra contra beta-actina (ab8229) – Abcam, Cambridge Science Park, UK.
- anticòs de cabra contra tubulina (ab4074) – Abcam, Cambridge Science Park, UK.
- anticòs secundari de cabra contra IgG de conill, biotinitat (31820) – PIERCE Biotechnology Inc., Rockford, IL, EEUU.
- anticòs secundari de conill contra IgG d'ovella, biotinitat (6150.08) – LabClinics, Barcelona.
- anticòs secundari de conill contra IgG de cabra, conjugat amb peroxidasa (PO449) – DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark.
- anticòs secundari de porc contra IgG de conill, conjugat amb peroxidasa (PO217) – DAKO
- anticòs secundari de conill contra IgG d'ovella, conjugat amb peroxidasa (PO163) – DAKO
- anticòs secundari de conill contra IgG de conill porcí, conjugat amb peroxidasa (PO141) – DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark.
- anticòs secundari de cabra contra IgG de conill, conjugat a Alexa Fluor 568 (TRITC) (A-11011)– Molecular Probes, Invitrogen, San Diego, CA, EEUU.
- anticòs secundari de cabra contra IgG de conill porcí, conjugat a Alexa Fluor 568 (TRITC) (A-11075) – Molecular Probes, Invitrogen, San Diego, CA, EEUU.
- anticòs secundari de conill contra IgG de conill porcí, conjugat a Alexa Fluor 488 (FITC) (A-11073) – Molecular Probes, Invitrogen, San Diego, CA, EEUU.
- streptavidina conjugada amb Alexa Fluor 488 (FITC) (S-11223) – Molecular Probes, Invitrogen, San Diego, CA, EEUU.
- streptavidina conjugada amb Alexa Fluor 568 (TRITC) (S-11226)– Molecular Probes, Invitrogen, San Diego, CA, EEUU.
- streptavidina conjugada amb Alexa Cy5 (PA45001) – Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EEUU.
- Hoechst (B2261) - Sigma Chemical Co., Saint Louis, Missouri, EEUU.
- TUNEL – Kit Roche (1.684817) - F.Hoffmann, Roche Diagnostics Corp., IN, EEUU.

2. MÈTODES

2.1. Obtenció i anàlisi de DNA.

2.1.1. Preparació de DNA plasmídic.

Per a l'obtenció de petites quantitats de DNA plasmídic (3-4µg) es van realitzar **minipreparacions** segons el protocol de lisi alcalina de Birnboim i Doly (1979). Consisteix en la degradació de la paret bacteriana per l'acció de la lisozima, seguida d'una lisi alcalina de l'esferoplast i una precipitació selectiva del DNA genòmic bacterià i de proteïnes desnaturalitzades per una solució concentrada d'acetat potàssic a pH àcid. El DNA plasmídic es purifica després mitjançant extraccions fenol-cloroform i es precipita amb isopropanol. El RNA bacterià és degradat amb RNAsa A.

Solució de lisozima

| | |
|---------------|--------|
| Tris-Hcl pH 8 | 25 mM |
| EDTA | 10 mM |
| Glucosa | 50mM |
| Lisozima | 5mg/ml |

Solució de lisi

| | |
|------|-------|
| NaOH | 0,2 M |
| SDS | 1 % |

Solució d'acetat potàssic pH 4,8

| | |
|---------------------|-----|
| Acetat potàssic | 3 M |
| Àcid acètic glacial | 2 M |

L'obtenció de grans quantitats de DNA es realitzava mitjançant **maxipreparacions** de DNA a partir de 250-500 ml de medi de cultiu. El mètode es basa igualment en una lisi alcalina, però la purificació del DNA es realitza amb unes columnes de Qiagen^{MR}.

2.1.2. Manipulació enzimàtica del DNA.

Es digeriria el DNA amb endonucleases de restricció en relació de 5 unitats d'enzim/µg de DNA. El temps de digestió del DNA plasmídic era unes 1-2 hores, i el DNA genòmic, tota la nit.

2.1.3. Aïllament i purificació de fragments de DNA.

2.1.3.1. Gels d'agarosa

La visualització dels fragments de DNA s'aconseguia mitjançant Bromur d'Etidi (0,5µg/ml) que s'intercala entre les cadences de DNA i dóna un color taronja quan és sotmès a llum ultravioleta. Es van utilitzar gels d'agarosa en tampó TAE del 1% i marcadors de pes molecular de DNA de l'I al VII de Boehringer Mannheim.

Tampó d'electroforesi (TAE 1x)

| | |
|--------------------|-------|
| Tris-acetat pH 8,3 | 40 mM |
| EDTA | 1 mM |

Tampó de càrrega 10x

| | |
|--------------------|---------------|
| Glicerol | 50% (vol/vol) |
| EDTA | 100 mM |
| SDS | 1% (p/vol) |
| Blau de bromofenol | 0,1% (p/vol) |

2.2. Purificació de fragments de DNA per GeneClean.

La purificació de DNA de l'agarosa es realitzava mitjançant el kit comercial Turbo Gene Clean® (Roche).

2.3. Purificació de fragments de DNA per electroelusió.

Aquesta tècnica es va utilitzar per a la purificació del transgèn, ja que extreu el DNA de forma molt neta sense deixar cap residu que posteriorment pugui ser tòxic per a l'embrió. El DNA es va aïllar seguint les instruccions del kit comercial BIOTRAP BT 1000 (Schleicher & Schull, Dassel, Alemanya).

2.4. Construcció de molècules híbrides de DNA.

Per a la construcció de molècules híbrides de DNA a partir de diferents fragments, aquests eren purificats i combinats amb DNA lligasa del bacteriòfag T4 (Pharmacia-LKB, Uppsala, Suècia). Els productes resultants de les lligacions eren introduïts en cèl.lules competents TOPO d'*E.coli* mitjançant un *heat shock*, consistent en deixar les cèl.lules competents juntament amb el DNA en gel durant 5 minuts, passar-les a 42°C durant 45 segons i tornar-les al gel durant 10 minuts. Les cèl.lules que havien incorporat el plàsmid eren seleccionades mitjançant el creixement en placa amb medi LB+l'antibiòtic pel qual el plàsmid codifica la resistència.

2.5. Tècnica d'obtenció de ratolins transgènics.

La tècnica utilitzada va ser la microinjecció de DNA en el pronucli masculí d'òcits fecundats de ratolí, portada a terme per la Unitat d'Animals Transgènics (UAT) de CBATEG.

2.6. Detecció dels animals transgènics.

Per tal de determinar la presència del gen quimèric en els ratolins es van utilitzar les tècniques de *Southern blot* i PCR. En ambdós casos es partia de DNA genòmic obtingut a partir d'un fragment de la cua del ratolí.

2.6.1. Obtenció de DNA genòmic.

Fragments de cua, d'uns 0,5 cm, d'animals de tres setmanes d'edat es digerien en una solució tamponada que contenia proteinasa K i SDS i s'incubava a 56°C tota la nit. Aquesta incubació permet la digestió del teixit per la proteinasa K, alliberant-se el DNA genòmic de les cèl·lules. Posteriorment es purificava el DNA. S'afegien 250µl d'una solució de NaCl 5M, es centrifugava durant 15 minuts a 12000xg i es recuperava el sobrenadant. A partir d'aquest sobrenadant es precipitava el DNA genòmic mitjançant l'addició de 500µl d'isopropanol i es centrifugava de nou 15 minuts a 12000xg. Es descartava el sobrenadant mitjançant aspiració i posteriorment es rentava el *pellet* de DNA amb etanol 70%. Es tornava a centrifugar durant 10 min a 12000xg i es descartava de nou el sobrenadant per aspiració. Finalment el DNA es resuspensia en 65µl d'aigua miliQ, prèviament escalfada a 56°C per afavorir la resuspensió. El DNA obtingut s'analitzava posteriorment mitjançant *Southern blot*.

Solució de llisi

| | |
|-----------------|---------------|
| Tris-HCl pH 8.5 | 100 mM |
| EDTA pH 8 | 5 mM |
| SDS | 0.2 % (p/vol) |
| NaCl | 200 mM |
| Proteinasa K | 5 mg/mL |

2.6.2. Anàlisi del DNA per Southern blot.

2.6.2.1. Digestió i electroforèsi del DNA genòmic.

Es digerien 10 µg del DNA genòmic durant tota la nit a 37°C amb l'enzim de restricció *Bam HI* tant per la detecció del transgèn RIP-I/IGF-I com per RIP-I/VEGF. El dia següent, s'afegia tampó de càrrega 10x (Glicerol 50%, EDTA 100mM, SDS 1% i blau de bromofenol 0,1%) al DNA genòmic digerit i es realitzava una electroforèsi en gels de l'1% d'agarosa/TAE 1x. En l'electroforèsi de DNA s'utilitzà com a marcador de pes molecular el *DNA Molecular Weight Marker X* (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). Es deixaven córrer les digestions durant 3-4 hores entre 50-60 volts. Posteriorment es realitzava el tractament del gel per tal de permetre la transferència del DNA a la membrana de *nylon*, aquest tractament consistia en: 15 minuts en una

solució HCl 0.25M, per aconseguir la despurinització i assegurar la transferència filtre dels fragments d'elevat pes molecular; 15 minuts en un solució alcalina (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) per tal de desnaturalitzar el DNA i facilitar-ne també la transferència; i un mínim de 20 minuts en una solució neutralitzant (1M Tris, 3M NaCl) que permetrà neutralitzar el pH i carregar negativament el DNA de nou.

TAE 1x

| | |
|----------------|---------------|
| Tris-acetat | 40 mM, pH 8,3 |
| EDTA | 1 mM |
| Bromur d'etidi | 0.5 µg/ml |

2.6.2.2. Transferència del DNA a la membrana.

Després del tractament del gel d'agarosa es realitzava la transferència del DNA des del gel a membranes de *nylon* carregades positivament (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN - ref.1 417 240). El mètode de transferència utilitzat era el sistema Turboblotter[®] (Schleicher & Schuell, Kenne, New Hampshire). Aquest sistema permet la transferència del DNA mitjançant capil·laritat per pressió negativa en tampó d'alta força iònica (10xSSC) a través de papers absorbents (GB002 i GB004 - Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire). La transferència es realitzava en un mínim de 2 hores, però es pot deixar també durant la nit. Un cop finalitzada, el DNA es fixava a la membrana de nylon mitjançant la irradiació de 120000µJ de llum ultravioleta un 25-50 segons, amb el sistema UV-Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, CA). Aquesta irradiació permet la creació d'unions covalents entre el DNA i la membrana.

20xSSC

| | |
|--------------|---------------|
| NaCl | 3 M |
| Citrat sòdic | 0.3 M, pH 7,4 |

2.6.2.3. Marcatge radioactiu de les sondes de DNA.

Les sondes utilitzades en els Southern blot es marcaven radioactivament amb [α -³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham Corp., Arlington Heights, Ill.) El marcatge es realitzava a partir del preparat comercial "Ready-To-GoTM DNA Labelling Beads (-dCTP)" (ref. 27-2940-01, Amersham Biosciences) seguint les instruccions del fabricant. Un cop marcades, les sondes es filtraven mitjançant gel filtració en columnes de Sephadex G-50 (Probe Quant G-50 Micro Columns, Amersham Pharmacia Biotech), que permetien separar els nucleòtids radioactius no incorporats a la sonda i reduir així la radioactivitat inespecífica.

2.6.2.4. Hibridació de la membrana.

A continuació es procedia a la realització de la prehibridació, durant unes 2 hores a 65°C. La solució de prehibridació conté principalment proteïnes, detergents com el SDS i ssDNA que bloquegen la membrana que no conté DNA fixat, reduint així la hibridació inespecífica. Posteriorment es realitzava la hibridació durant tota la nit amb la sonda marcada radioactivament (3-5.10⁶cpm/ml), en agitació rotacional a 65°C..

Solució de prehibridació i hibridació

| | |
|--|--------------|
| Na ₂ HPO ₄ - pH 7.2 | 0,25 mM |
| SDS | 10% (p/vol) |
| EDTA | 1 mM |
| Blocking reagent (Roche) (ref. 1096176) | 0.5% (p/vol) |

2.6.2.5. Rentats de la membrana i revelat.

Després de la hibridació, les membranes es rentaven per eliminar la sonda en excés i la radioactivitat inespecífica que es mantingués unida a la membrana per unions molt dèbils. Es realitzaven 3 rentats consecutius, cada un d'una astringència superior: 2 rentats, de 10 minuts cada un, amb una solució de baixa astringència, a 30°C en agitació rotacional; i un rentat de 15 minuts a 65°C en agitació rotacional amb una solució d'alta astringència. Finalment, les membranes s'exposaven a una pel·lícula fotogràfica o a una pantalla radiosensible per tal d'obtenir la senyal que permetia la genotipació dels animals.

Solució de baixa astringència: 2x SSC, 0.1% SDS

Solució d'alta astringència: 0.1x SSC, 0.1% SDS

2.6.3. Anàlisi del DNA per PCR.

L'anàlisi del DNA per PCR és un mètode que permet detectar els animals transgènics molt més ràpidament que la tècnica del *Sothern blot*, si es disposa dels primers adequats. La PCR s'utilitzava per la detecció tant dels animals transgènics RIP-I/VEGF com RIP-I/IGF-1.

En les dues PCRs, els primers amplificaven una banda d'uns 200pb procedent del transgèn d'ambdós models animals, de la regió comuna del promotor RIP-I amb l'intró β-globina.

RIP-I fwd: 5' – AAG TGT TTG GAA AAT TAC GGC - 3'

β-globinaI rev: 5' – ATA CCCTGA TTG CCT TGA A - 3'

Les condicions eren les següents :

Mix - 5 µl Buffer (5x)

2 μl Mg^{2+} (25mM)
0,2 μl dNTP mix (25 mM cadascun)
1 μl oligos mix (10 mM cadascun)
0,1 μl Taq pol. (5 U/ μl)
200-300ng DNA mostra
H₂O miliQ fins a volum total 25 μl

El cicle era el següent:

2 min a 95°C (Hot start)

40 cicles 30'' a 94°C

20'' a 58°C

30'' a 72°

1 min a 72°C

manteniment a 4°C

2.7. Extracció d'illots pancreàtics.

Els illots pancreàtics s'extreien a partir de la digestió del pàncrees i posterior aïllament dels illots. Per tal de digerir els pàncrees, els ratolins es sacrificaven i se'ls perforava el pàncrees mitjançant la injecció, via colèduc, d'una solució de 1 mg/ml de col·lagenasa P en Hank's-BSA (Collagenase P; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Un cop perfosos, els pàncrees es digerien en la mateixa solució que s'havia preparat per realitzar les injeccions, durant uns 10 minuts a 37°. Un cop digerits, es filtrava tot el contingut de la digestió i s'aturava la reacció afegint-hi Hank's-BSA fred sense col·lagenasa, i fent 3 rentats de 5, 3 i 2 minuts amb Hank's-BSA fresc per eliminar les restes de col·lagenasa. Posteriorment s'obtenien els illots pescant-los amb pipeta sota la lupa binocular. Els illots pescats es mantenien en una solució de Hank's-BSA en gel, fins a que s'obtenien tots. Un cop acabat es feia un rentat amb Hank's sense BSA, i un últim rentat amb PBS 1x. Finalment s'obtenia un *pellet* d'illots que es resuspenia amb TriPure[®] o amb tampó d'homogeneïtzació de proteïnes, segons si es volgués obtenir RNA o proteïnes a partir d'aquests illots.

Hank's (Quantitats per preparar 1 L)

| | | |
|---|--------|--|
| NaCl | 8 g | <i>Nota:</i> La solució de Hank's es preparava dies abans i es guardava filtrada (0,22µm) a 4°C. |
| KCl | 400 mg | |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 155 mg | |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 200 mg | |
| Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O | 127 mg | |
| KH ₂ PO ₄ | 60 mg | |
| Gassejar durant 10 min amb carbogen (95% O ₂ , 5% CO ₂) | | |
| Afegir NaHCO ₃ | 380 mg | El mateix dia en que es realitzava l'obtenció dels illots, s'hi afegia 1mg/ml de BSA i 5 mM de glucosa. A partir d'aquesta solució es preparava la solució de col·lagenasa i les posteriors solucions de rentat i pesca dels illots. |
| Ajustar el pH a 7,4 | | |

En els estudis amb illots obtinguts d'animals tractats amb STZ, els illots (dels animals tractats i no tractats) eren tenyits per ajudar a la seva identificació sota la lupa. La tinció es realitzà amb una incubant durant 5 min els illots en 50 ml de Hank's-BSA-glucosa amb 500µl d'una solució de ditizona (13 mM) i, posteriorment es rentaven amb Hank's-BSA-glucosa sense ditizona.

Solució de ditizona (Sigma):

10 mg ditizona
3 ml etanol absolut
50 µl hidròxid d'amoni concentrat

2.8. Extracció de RNA.**2.8.1. Extracció de RNA d'illots pancreàtics.**

L'obtenció de RNA d'illots pancreàtics es realitzava mitjançant l'ús de la solució TriPure[®] Isolation Reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) i seguint el protocol comercial de purificació de RNA en columna de Rneasy Mini Kit de QIAGEN (Cat.No.74104, QIAGEN, Invitrogen). El mateix protocol inclou un tractament amb DNases. El RNA quedava finalment resuspès en un volum de 30 µl d'aigua lliure de RNAses. Finalment, es determinava la concentració de RNA de les diferents mostres mesurant l'absorbància a 260nm i la puresa amb la *ratio* de les absorbàncies a 260 i 280.

2.8.2. Extracció de RNA de pàncrees total.

L'obtenció de RNA de pàncrees total es realitzava mitjançant l'ús de la solució TriPure[®] Isolation Reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) i seguint el protocol

comercial a partir d'una petita biòpsia de pàncrees fresc, acabat d'extreure. Aquest protocol es basa en el mètode descrit per Chomczynski & Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987). Les mostres s'homogeneïtzaven utilitzant un homogeneïtzador de tipus Polytron[®]. S'utilitzaren uns 100 mg de teixit per cada 1 mL de solució TriPure[®]. En aquest mètode la separació del RNA es realitzava mitjançant fenol-cloroform i la protecció es donava gràcies a la solució de guanidina tiocianat, que actua com a inhibidor de ribonucleases. Després de la precipitació del RNA amb isopropanol i dels posteriors rentats amb etanol al 75%, el RNA es resuspenia amb aigua amb dietilpirocarbonato (DEPC), que actua com a inhibidor de ribonucleasas, escalfada a 56 °C. El RNA es resuspenia en un volum entre 50-80 µl depenent del rendiment de l'extracció. Finalment, es determinava la concentració de RNA de les mostres mesurant l'absorbància a 260nm i la puresa amb la *ratio* de les absorbàncies a 260 i 280.

2.9. PCR quantitativa a temps real.

Per tal de quantificar els nivells d'expressió gènica en illots pancreàtics o pàncrees total, s'utilitzà la tècnica de PCR a temps real, també anomenada PCR quantitativa (*Q-PCR*). La determinació dels nivells d'expressió gènica requereix de dos passos: un primer pas per obtenir cDNA a partir de les mostres de RNA, obtingudes prèviament tal i com s'ha descrit anteriorment; i un segon pas consistent en la PCR a temps real a partir d'aquest cDNA. En un volum final de 20µL, i a partir d'1µg de RNA total, s'obtingué el cDNA mitjançant el producte comercial *Omniscript RT[®] kit* (QIAGEN Sciences, Maryland, USA). En aquesta reacció de retro-transcripció s'utilitzaren *random primers* com a primers de la reacció (Invitrogen) i el producte comercial *Protector RNase Inhibitor* com a inhibidor de Rnases (Roche Diagnostics). Un cop obtinguts els cDNAs de les diferents mostres de RNA es determinà l'expressió gènica mitjançant PCR a temps real, utilitzant el sistema *SmartCycler II[®]* (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) i el producte comercial *QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR* (QIAGEN Sciences, Maryland, USA). Cada reacció de 25 µl contenia: 2µL d'una dilució 1:2 del cDNA, 12.5µL de la *QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR Master mix* (MgCl₂ 2.5 mM) i el parell de primers *forward i reverse* específics per a cada gen determinat, a una concentració final de 0.4µM. Les seqüències dels primers utilitzats foren les següents:

| GEN | Primer 5' (forward) | Pimer 3' (reverse) | Temp. °C |
|-------------|---------------------------|------------------------|----------|
| Glucquinasa | TGAGCCGGATGCAGAAGG | GCAACATCTTTACACTGGCCT | 60 |
| GLUT-2 | CTGGAGCCCTCTTGATGGGA | CCAGTCCTGAAATTAGCCCAC | 61,9 |
| HNF3β | GGCTCCTTCTGGACCCTG | ACCTCGCTTGTGCTCCTG | 55 |
| Pdx-1 | CGGACATCTCCCCATACG | AAAGGGAGCTGGACGCGG | 55 |
| Cilina D1 | GGCAGCCCCAACAACTTC | TCCCGCCTGCCCGGTGG | 63 |
| Ciclina D2 | AGGATGATGAAGTGAACACA | AGAAGGGGGCTAGCAGATGA | 63 |
| p21 | GAGGCCAGTACTTCCTCTG | AAGGCCGAAGATGGGGAAGA | 63 |
| p27 | AGGCGGTGCCTTTAATTGGG | TTACGTCTGGCGTCAAGGC | 63 |
| PECAM-1 | CTGGTGCTCTATGCAAGCCTC | CGGTGCTGAGACCTGCTTT | 60 |
| IL-1β | CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG | GATCCACACTCTCCAGCTGCA | 60 |
| TNF-α | CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA | TGGGAGTAGACAAGGTACACCC | 60 |
| IL-6 | AGTTGCCTTCTTGGGACTGA | TCCACGATTTCCCAGAGAAC | 60 |
| MCP-1 | CCCAATGAGTAGGCTGGAGA | TCTGGACCCATTCTTCTTG | 60 |
| CCR-2 | GGTCATGATCCCTATGTGGG | TCCATGAGCAGTGGTTTGAA | 56 |
| MMP-2 | GACCTTGACCAGAACACCATC | CATCCACGGTTTCAGGGTCC | |
| RBS | ATTCGCTGCACGAAGTGGG | CAGCAGGTCTGAATCGTGGT | 60 |

Les condicions de temps i temperatura utilitzades en les PCRs van ser: un primer cicle de 15 minuts a 95°C, seguit de 45 cicles d'amplificació (fase de desnaturalització: 15 segons a 95°C; fase d'aparellament dels oligonucleòtids: 30 segons a la temperatura fixada per cada parella de primers i que es mostra en la taula anterior; fase d'extensió: 30 segons a 72 °C). Cada reacció es realitzà per triplicat a partir de les mostres de cDNA de ratolins control i transgènics de diferents experiments. La tecnologia *SmartCycler II*[®] ens proporcionà, per a cada gen analitzat, el càlcul de la C_t de cada mostra per cada triplicat. La C_t correspon al número de cicle en que es produeix l'increment significatiu de fluorescència en la reacció, el qual és proporcional al número de molècules de cDNA que hi havia en un principi. A partir de les C_t , es calculava el nivell d'expressió gènica dels diferents gens analitzats en ambdós grups d'animals mitjançant la fórmula matemàtica descrita per Pfaffl (Pfaffl, 2001). Per poder determinar les diferències en l'expressió gènica dels grups experimentals, es va normalitzar el nivell d'expressió dels diferents gens analitzats per la quantitat de cDNA total present en cada mostra. Per tal de determinar aquesta quantitat de cDNA total es van determinar els nivells d'expressió d'un gen *housekeeping*, l'expressió del qual no estigués alterada en els diferents grups experimentals. En els nostres càlculs utilitzarem com a *housekeeping* el gen RBS. Els resultats s'expressen com la relació entre el nivell d'expressió del gen en cada grup experimental respecte a les expressions en els animals control, estandarditzats per l'expressió del gen RBS en cada un d'ells (ratio= $2^{-\Delta C_t \text{ gen (Con-Tg)}} / 2^{-\Delta C_t \text{ RBS (Con-Tg)}}$). D'aquesta manera, les dades es representen com a l'expressió de mRNA de cada gen en cada grup experimental relativa al nivell d'expressió en els animals control.

2.10. Extracció i anàlisi de proteïnes.

2.10.1. Extracció de proteïnes d'illots pancreàtics.

L'extracció de proteïnes d'illots pancreàtics es feia a partir del *pellet* d'illots que obteníem rentant-los amb PBS 1x després d'haver-los pescat. Aquest *pellet* es resuspenia amb uns 80 µl del tampó d'homogeneització de proteïnes. Immediatament abans d'utilitzar el tampó d'homogeneització s'hi afegien els inhibidors de proteases (una pastilla d'inhibidors per cada 10mL de tampó – Complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets de Roche Diagnostics GMBH, Germany). Un cop resuspès el pellet d'illots es deixava 20 minuts en gel i finalment s'homogeneitzava mitjançant un ultrasonicador. Es centrifugava a 1000xg durant 2 minuts a 4°C. A partir d'aquest sobrenadant es determinava la concentració de proteïnes de l'extracte mitjançant el mètode Bradford. La resta d'extracte de proteïnes es guardava a -20°C fins a la seva propera utilització.

Tampó d'homogeneització de proteïnes

| | |
|-----------------------|--------|
| Tris-HCl pH 7,5 | 50 mM |
| Sacarosa | 270 mM |
| EGTA | 1 mM |
| EDTA | 1 mM |
| NaF | 50 mM |
| β-glicerofosfat sòdic | 10 mM |
| Tampó fosfat pH 7 | 5 mM |
| Tritón X-100 | 1% |
| Ortobanadat sòdic | 1 mM |

2.10.2. Determinació de la concentració de proteïnes.

Per tal de determinar la concentració de proteïnes dels diferents extractes es va utilitzar el mètode de Bradford. Aquest mètode es basa en el canvi de color del colorant blau brillant de coomassie quan forma complexos amb les proteïnes. Aquest canvi de color produeix un canvi en el màxim d'absorbància d'aquest cromòfor (de 465 a 595 nm). A partir d'una solució d'albumina sèrica bovina (BSA) a 1mg/ml es va realitzar una recta patró d'entre 0 i 20 µg de BSA. El volum de la reacció era d'1mL, dels quals 800µl eren la suma de l'aigua i els estàndards de la recta patró, i 200µl del reactiu de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, Manchen, Germany). La mateixa reacció es va realitzar amb les mostres dels diferents extractes. En el cas dels extractes de pàncrees total es realitzaren dilucions 1:50 de les mostres; en el cas dels extractes d'illots

pancreàtics no fou necessari realitzar dilucions. Després d'afegir el reactiu de Bradford les mostres es sacsejaren i s'incubaren durant 5-10 minuts a temperatura ambient. Posteriorment es determinà l'absorbància de les mostres a una longitud d'ona de 595nm. La concentració de proteïna dels diferents extractes s'obtingué a partir de la interpolació de les seves absorbàncies a la recta patró calculada.

2.10.3. Anàlisi de l'expressió de proteïnes mitjançant Western blot.

2.10.3.1. Electroforèsi en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE).

L'anàlisi de l'expressió de proteïnes es realitzà mitjançant l'electroforèsi dels diferents extractes proteics en gels de poliacrilamida al 10%, en presència de SDS (Laemmli, 1970). El gel de poliacrilamida SDS-PAGE es formà a partir de la fusió de dos ges. El primer gel és el de compactació o *stacking*, el qual contenia un 3,9% de poliacrilamida i contenia els pous a on es dipositaven les mostres. El segon, es tracta del gel separador o *resolving*, aquest contenia un 10% de poliacrilamida i s'hi donava la separació de les proteïnes. Els diferents extractes proteics es descongelaren en gel. La quantitat de proteïnes a carregar es va barrejar amb 1/5 volum de tampó de càrrega Laemli 5x (Tampó fosfat 20 mM, Glicerol 20%, SDS 4%, 2- β -mercaptoetanol 2% i blau de bromofenol com a colorant). Un cop preparades les mostres, les proteïnes es desnaturalitzaren a 90°C durant 2 minuts, les mostres es carregaren immediatament després en el gel SDS-PAGE. El tampó utilitzat per a l'electroforèsi fou el següent: Tris base 5 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1% (pes/vol). L'electroforèsi es va realitzar a 50V mentre les mostres creuaven el gel de compactació, i posteriorment a 80V quan es trobaven ja en el gel separador. A l'electroforèsi es van utilitzar marcadors de pes molecular per proteïnes pre-tenyits (Pre-stained SDS-PAGE Standarts broad range, Calog 161-0318, BioRad Laboratories, Hercules, CA, EEUU).

2.10.3.2. Transferència de proteïnes a membranes i immunodetecció.

L'electrotransferència de les proteïnes des del gel a les membranes de PVDF (Hyperbond-P, Amersham Biosciences) es realitzava amb l'aparell Transblot model 2051 de LKB/Pharmacia, a 100V durant dues hores a 4°C en un tampó d'electrotransferència (Tris 25 mM, Glicina 150 mM, Metanol 20%). Després de la transferència les membranes es tenyien amb Ponceau per tal de comprovar la qualitat de les proteïnes i la homogeneïtat en la càrrega dels diferents pous. Posteriorment les membranes es rentaven per eliminar el Ponceau i es bloquejaven. El bloqueig es realitzava amb TBS-T (Tris-HCl 25 mM, NaCl 137 mM, Tween20 0.05%) amb un 5% de llet desnatada en pols, o bé TBS-T amb un 5% d'albumina sèrica bovina (BSA), dependent del

protocol de l'anticòs a utilitzar. El bloqueig es realitzava durant 2 hores en agitació a temperatura ambient. Posteriorment, les membranes s'incubaven amb els anticossos primaris diluïts en la mateixa solució utilitzada pel bloqueig. La incubació es realitzava en agitació, a 4°C durant tota la nit. L'endemà les membranes es rentaven amb TBS-T (3 rentats ràpids i 3 de 5 minuts) i s'incubaven durant mitja hora, en agitació, a temperatura ambient amb els corresponents anticossos secundaris, conjugats amb peroxidasa i diluïts 1:2000 en la mateixa solució que s'havia utilitzat pel bloqueig. Finalment les membranes es rentaven de nou amb TBS-T (3 rentats ràpids i 2 de 5 minuts) i TBS1x (un últim rentat de 5 minuts). La immunodetecció es realitzava mitjançant el producte comercial ECL+® Western Blotting analysis system (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany) seguint el protocol del fabricant. La membrana tractada amb ECL+® s'exposava a un film fotogràfic per tal de visualitzar la senyal.

2.11. Determinació de paràmetres sèrics.

El sèrum s'obtenia o bé a partir de mostres de sang de 20-30 µl obtingudes per la cua; o bé a partir de la decapitació dels ratolins en els estudis de punt final. En tots dos casos la sang es recollia en tubs no heparinitzats i es deixava coagular durant 20 min a 4°C, posteriorment es centrifugava a 6000xg durant 20 minuts per a l'obtenció del sèrum, aquest es mantenia congelat (-20°C) fins al moment de la determinació dels diferents paràmetres.

2.11.1. Glucosa

Els nivells de glucosa sèrica es determinaven a partir d'una gota de sang (5 µl) procedent de la cua dels ratolins, mitjançant el sistema Glucometer Elite™ (Bayer, Leverkusen, Germany).

2.11.2. Insulina

La insulina circulant es determinava a partir de 5 µl de sèrum quan s'obtenien mostres de sang de la cua dels ratolins a punts mig dels experiments, mitjançant ELISA (*Rat Insulin ELISA kit* (Crystal Chemical, Chicago, IL). La insulina de ratolí presenta una reactivitat creuada del 100%, comparada amb la de rata. En el cas d'estudis de punt final, en que s'obtenia més volum de sèrum (100µl), la concentració d'insulina es determinava per radioimmunoassaig (RIA) mitjançant el kit INSULIN-CT (CIS Biointernational, Gif-Sur-Yvette Cedex, França), aquest mètode té un límit de sensibilitat de 30 pM i una variació intrassaig del 6%.

2.11.3. VEGF

Els nivells de VEGF total (totes les isoformes) en sèrum es determinaven per ELISA a partir dels sèrums obtinguts en els estudis de punt final. El kit que es va utilitzar és *VEGF ELISA MOUSE kit* QIA52 (Calbiochem).

2.12. Test de tolerància a la glucosa.

El test de tolerància a la glucosa s'utilitza per comprovar si els ratolins són capaços de respondre correctament a una sobrecàrrega de glucosa, valorant així el nivell de tolerància al sucre. Aquells animals que mantenien les glucèmies elevades i no recuperaven els nivells basals de glucosa durant el test eren considerats animals intolerants a la glucosa. Els animals escollits per a la realització del test es dejunaven durant 16 hores, passades les quals es pesaven i se'n determinava la glucèmia basal a partir d'una gota de la vena de la cua mitjançant el sistema Glucometer Elite[®]. Posteriorment se'ls injectava intraperitonealment una dosi de 2 g de glucosa/Kg de pes viu. A partir d'aquest moment es realitzaven extraccions de sang seriates amb un interval primer de 15 i després de 30 minuts fins a les 2 hores després de l'inici del test per tal de determinar l'evolució de la glucèmia. Durant aquest temps els animals no tenien accés ni al menjar ni a l'aigua. Els resultats s'expressaven com les glucèmies en mg/dL en els diferents punts de l'experiment.

2.13. Secreció d'insulina *in vivo*.

Quan interessava quantificar i valorar la secreció d'insulina *in vivo* dels diferents animals en resposta a la sobrecàrrega de glucosa, es realitzava paral·lelament al test de tolerància a la glucosa, descrit en el punt 2.12. A la mateixa vegada que es prenen les mesures de glucèmia durant el test, s'obtenien uns 30 µl de sang a partir de la vena de la cua, en tubs no heparinitzats. Un cop finalitzat el test la sang es deixava coagular i posteriorment es centrifugava a 6000xg, 20' a 4°C i se n'obtenia el sèrum. A partir d'aquests sèrums es determinava la concentració d'insulina tal i com es descriu en el punt 2.11.2. Els resultats s'expressaven com les insulinèmies ng/ml en els diferents punts de l'experiment.

2.14. Inducció de diabetis experimental mitjançant STZ.

L'estreptozotocina (STZ) és un antibiòtic d'ampli espectre derivat de *Streptomyces acrhomogenes* d'estructura constituïda per una molècula de N-metil-N-nitrosurea unida al C-2 de la D-glucosa. És un tòxic que actua majoritàriament sobre la cèl·lula β pancreàtica, a la qual destrueix. El mecanisme de toxicitat sobre aquestes cèl·lules es dona a través del reconeixament del transportador de glucosa GLUT-2, la part d'estructura similar a la glucosa que té aquesta droga permet l'entrada a les cèl·lules que tenen aquest sistema de transport.

L'administració de 5 dosis consecutives de STZ indueix una infiltració limfocitària dels illots (insulitis) que destrueix la cèl·lula β i causa una diabetis oberta. L'estreptozotocina es va dissoldre en una solució de citrat sòdic 10 mM amb 0.9 % NaCl, pH 4.5, immediatament abans de la seva administració. Es van administrar 5 dosis consecutives de STZ via intraperitoneal de 20 o 40 mg/Kg de pes corporal segons cada estudi.

2.15. Anàlisi immunohistoquímica del pàncrees.

Els pàncrees dels ratolins es fixaven amb una solució tamponada de formol al 10% durant 24 hores a 4°C i a continuació s'inclouïen en parafina (includor tipus Histokinette) i se n'obtenien seccions (2-3 μ m) amb l'ajut d'un microtom, les quals posteriorment es desparafinaven i es processaven. Les seccions s'incubaven durant tota la nit a 4°C amb els anticossos corresponents: contra insulina (1/100), contra glucagó (1/100), contra GLUT-2 (1/400), contra Cdk-4 (1/100), contra ciclina D1 (1/250), contra p27 (1/300), col.lagen IV (1/500) i F4/80 (1/100). Posteriorment s'incubaren amb els corresponents anticossos secundaris (1/300) i streptavidina conjugada amb fluoròfors en el cas de les immunohistoquímiques en fluorescència (1/300). Com a cromogen s'utilitzava la diaminobenzidina (DAB). Tots els anticossos utilitzats són els descrits anteriorment en la part de Materials.

Per la captació d'imatges es va utilitzar un microscopi Nikon Eclipse E800 (Nikon Corp., Tokio, Japó) connectat a una camera digital SONYTM eCCD i un microscopi confocal Leica TCs SP2 (Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Alemanya). Les mesures d'àrees i el comptatge de nuclis es van dur a terme amb el microscopi Nikon i un analitzador d'imatges (analySIS3.0, SoftImaging System Corp., Lakewood, Co).

2.15.1. Determinació de la massa de cèl·lula β .

L'àrea de cèl·lules β del pàncrees es delimitava mitjançant la immunodetecció de la insulina, contrarrestada amb Mayer's hematoxilina. El percentatge de cèl·lula β es va calcular dividint el sumatori de les àrees que presentaven positivitat per la insulina en una secció de pàncrees per l'àrea total de la secció i multiplicant aquesta relació per 100. La massa de cèl·lula β es va calcular multiplicant el pes del pàncrees pel percentatge de l'àrea de cèl·lula β obtingut. Per aquestes anàlisis morfològiques les immunohistoquímiques d'insulina es van mesurar les àrees de 4 seccions (3 μm) separats cadascuna per unes 100 μm (diàmetre mig aproximat d'un illot de ratolí), d'aquesta manera s'evitaven les variacions degudes a les diferents zones del pàncrees.

2.15.2. Detecció d'apoptosi en la cèl·lula β .

La mesura de l'apoptosi es va realitzar mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica de TUNEL. Per tal de realitzar aquesta immunohistoquímica les mostres es desparafinaven i seguidament es tractaven amb Proteinasa K (10 $\mu\text{g/ml}$) amb Tris/HCl, pH 7.6, uns 10 min a 37°C i es permeabilitzaven amb Triton X-100 (0.1%) amb PBS 1x durant 2 min. Finalment, es realitzava una doble tinció per detectar apoptosi en les cèl·lules β , utilitzant un marcatge terminal amb dideoxinucleòtids dUTP mitjançada per dideoxinulceotiltransferasa (TdT), kit de detecció de mort cel·lular In situ (Roche), i un anticòs de conill porcí contra insulina (1/100), Com a anticòs secundari s'utilitzava un anticòs de cabra contra conill porcí marcat amb biotina (1/300) i streptavidina marcada amb Alexa 568 (1/300). A més, es contrastaven les mostres amb Hoechst (1/100) per descartar falsos positius i assegurar que eren nuclis i no eritròcits. Per cada animal, es realitzaven 3 seccions per animal separades entre elles 100 μm i s'hi comptaven com a mínim 5000 nuclis envoltats de senyal positiva per insulina.

2.15.3. Detecció de replicació en la cèl·lula β .

La mesura de la replicació en les cèl·lules β es va realitzar mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica de Ki67. Aquesta proteïna s'ha descrit que s'expressa a nivells baixos durant la fase final de G1 i s'acumula durant les fases S, G2 i M (Starborg, 1996), per tant, s'utilitza en molts casos com indicador de replicació. Mostra les cèl·lules amb cert potencial per replicar, però no exactament les que en aquell moment s'estan dividint. Per tal de realitzar aquesta immunohistoquímica les mostres es desparafinaven i seguidament es tractaven amb Proteinasa K (10 $\mu\text{g/ml}$) amb Tris/HCl, pH 7.6, uns 10 min a 37°C i es permeabilitzaven amb Triton X (0.1%) amb PBS durant 2 min. Finalment, es va realitzar una doble tinció amb anticòs de conill porcí contra insulina (1:100), i contra Ki67 per detectar replicació en les cèl·lules β .

Com a anticòs secundari per la insulina s'utilitzà un anticòs de cabra contra conill porcí marcat amb biotina (1:200) i streptavidina marcat amb TEXAS RED (1:100). A més, les mostres es contrastaven amb Hoechst (33258) per descartar falsos positius i assegurar que eren nuclis i no eritròcits. Per cada animal, es realitzaven 3 seccions per animal separades entre elles 100µm i s'hi comptaven com a mínim 5000 nuclis envoltats de senyal positiva per insulina.

2.16. Anàlisi dels tipus cel·lulars del pàncrees mitjançant FACS.

Per l'anàlisi de les cèl·lules immunes mitjançant la tècnica de FACS (*Fluorescence Analysis Cell Sorting*), es van obtenir extractes de cèl·lules vives de pàncrees total. Així, els pàncrees van ser perfosos pel ducte pancreàtic amb una solució de Hank's amb 1%BSA i 1mg/ml de col·lagenasa P, tal i com s'ha descrit a l'apartat 2.7. Els òrgans van ser extrets i digerits per separat cadascun amb 3 ml d'aquesta solució en un bany en agitació a 37°C durant 15 minuts. Una vegada el teixit era totalment disgregat, es va rentar dues vegades amb Hank's-BSA sense col·lagenasa i amb 5 mM EDTA. L'EDTA és un agent quelant d'ions bivalents com el Ca²⁺ i, les unions entre cèl·lula β són Ca-depenents, de manera que així s'afavoria la separació de les cèl·lules dels illots i permetia l'alliberació de leucòcits que poguessin estar dins. Els extractes de pàncrees obtinguts es van filtrar (100µm) per tal de separar les cèl·lules aïllades de teixit no digerit. A continuació, 100µl de cada extracte es van incubar durant 1 hora amb 1µl de cada anticòs, tots per separat. Els anticòsos utilitzats van ser: contra CD11b (marcador de macròfags), contra CD11c (de cèl·lules dendrítiques), contra CD19 (de limfòcits B), contra CD4 (de limfòcits T *helper*), contra CD8 (de limfòcits T citotòxics) Es van rentar els extractes i es van fer passar pel citòmetre de flux Cytomics FC 500MPC (Beckman Coulter).

2.17. Injecció intravenosa de Dextrà-Fluoresceïna.

Per visualitzar els vasos dels illots, es van injectar per la vena de la cua 10 ml/g per pes d'animal de dextrà-fluoresceïna (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) en solució de PBS (50mg/ml). Després de 10 minuts els animals es van sacrificar i els pàncrees es van fixar durant 12-24 hores en formalina, inclosos en parafina i posteriorment processats.

2.18. Anàlisi estadística.

Els resultats s'expressaven com a mitja ± error estàndard de la mitja. La comparació de resultats es realitzà mitjançant la t de Student-Newman-Keuls de dades no aparellades. Les diferències es consideraven estadísticament significatives amb una *P<0.05.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Abbas A.K., Lichtman A.H. and Pober J.S. (2000) *Cellular and molecular immunology, Third edition*. McGraw Hill.
- Accili D. and Arden, K.C. (2004) FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* **117**: 421-426
- Ackermann A.M. and Gannon M. (2007) Molecular regulation of β -cell mass development, maintenance, and expansion. *Journal of molecular endocrinology*, **38**: 193-206.
- Adorini L., Gregori S. and Harrison L.C. (2002) Understanding autoimmune diabetes: Insights from mouse models. *Trends Mol.Med.*, **8**: 31-38.
- Åkerblom H.K., Knip M. (1998) Putative environmental factors in type 1 diabetes. *Diabetes Metab.Rev.*, **14**: 31-67.
- Alberts, B., Lewis, R., and Roberts, W. (2000). *Molecular Biology of the Cell, Fourth edition*, Omega.
- Allison J., Malcolm L., Chosich N., Morahan G. and Miller J.F. (1992) Inflammation but not auto-immunity occurs in transgenic mice expressing constitutive levels of interleukin-2 in islet β cells. *Eur.J.Immunol.*, **22**: 1115-1121.
- Anderson, J.M., Balda, M.S., Fanning, A.S. (1993). The structure and regulation of tight junction. *Curr Opin Cell Biol* **5**:772-778.
- Andreoletti L., Hober D., Hober-Vandenberghe C., Belaich S., Vantuyghem M.C., Lefebvre J. and Wattré P. (1997) Detection of coxsackie B virus RNA sequences in whole blood samples from adult patient at the onset of Type 1 diabetes mellitus. *J.Med.Virol*, **52**: 121-127.
- André-Scumtz, I., Hindelang, C., Benoist, C., and Diane, M. (1999). Cellular and molecular changes accompanying the progression from insulinitis to diabetes. *Eur J Immunol* **29**:245-255.
- Araki E., Lipes M.A., Patti M.E., Bruning J.C., Haag B., Johnson R.S. and Kahn C.R. (1994) Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*, **372**: 186-190.
- Ashiya, M., and Smith, R. (2007). Non-insulin therapies for type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discovery* **6**: 777-778.
- Austin, J.M., and Gordon, S. (1981). F4/80, a monoclonal antibody specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* **11**:805-815.
- Babu, D.A., Deering, T.g., and Mirmira, R.G. (2007). A feat of metabolic proportions: Pdx1 orchestrates development and function in the maintenance of glucose homeostasis. *Mol Gen Metab* **92**:43-55.
- Balasa, B., La Cava, A., Van Gunst, K., Monick, L., Balakrishna, D., Nguyen, N., Tucker, L., and Sarvetnick, N. (2000). A mechanism for IL-10-mediated diabetes in the NOD mouse: ICAM-1 deficiency blocks accelerated diabetes. *The J Immun.* **165**: 7330-7337.
- Ballian, N., and Brunicardi, F.C. (2007). Islet vasculature as a regulator of endocrine pancreas function. *World J Surg.* **31**:705-714.
- Bates D.O., Curry F. (1997) VEGF increases microvascular permeability via Ca²⁺ dependent pathway. *Am. J. Physiol.* **273**, H687-694
- Beaudry, P., Hida, Y., Udawa, T. et al (2007) Endothelial progenitor cells contribute to accelerate liver regeneration. *J Pediatr Surg* **42**: 1190-1198
- Bedoya F.J., Solano F. and Lucas M. (1996) N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islet. *Experientia*, **52**: 344-347.
- Bell G.I. and Polonsky K.S. (2001) Diabetes Mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature*. **414**: 788-791.
- Ben-Shushan E., Marshak S., Shoshkes M., Cerasi E., Melloul D. (2001) A pancreatic beta-cell-specific enhancer in the human PDX-1 gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 3beta (HNF-3beta), HNF-1alpha, and SPs transcription factors. *J.Biol.Chem.*, **276** (20): 17533-17540.
- Bergerot, I., Fabien, N., Marguer, V., and Thivolet, C. (1995). IGF-I protects NOD mice from insulinitis and diabetes. *Clin Exp Immunol* **102**:335-340.
- Bernal-Mizrachi, E. Wen, W., Stahlhut, S., Welling, C.M., and Permut, M.A. (2001). Islet beta cell expression of constitutively active Akt1/PKB alpha induces striking hypertrophy, hyperplasia, and hyperinsulinemia. *J Clin Invest* **108**: 1631-1638.
- Bonner-Weir, S. (2001). Beta-cell turn-over. *Diabetes* **50(Suppl)**:S20-S24.
- Bonner-Weir, S., and Weir, G.C. (2005). New sources of pancreatic beta-cells. *Nat Biotechnol* **23**: 857-861.
- Bosco, D., Roullier, D.G., Halban P.A. (2007). Differential expression of E-cadherin at the surface of rat beta-cells as a marker of functional heterogeneity. *J Endron* **184**:21-26.
- Boucher M.-J., Selander L., Carlsson L. and Eldlund H. (2006) Phosphorylation marks IPF1/ PDX1 protein for degradation by Glycogen synthase kinase-3-dependent mechanisms. *J.Biol. Chem.*, **281**: 6395-6403.
- Bouwens L., Rooman I. (2005) Regulation of Pancreatic Beta-Cell Mass. *Physiol Rev*, **85**: 1255–1270.
- Brennard, K., Huangfu, D., and Melton, D. (2007). All beta cells contribute equally to islet growth and Maintenance. *PLoS Biol* **5**:e163.
- Brissova M., Blaha M., Spear C., Wright C.V.E., Powers A.C., et al. (2005) Reduced PDX-1 expression impairs islet response to insulin resistance and worsens glucose homeostasis. *Am.J. Physiol.Endocrinol.Metab.*, **288**: E707-E714.
- Brissova M., Wright C.V.E., Powers A.C., et al. (2002) Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *J.Biol.Chem.*, **277**: 11225-11232.

- Brissova, M., Fowler, M., Wiebe, P., Shostack, A., Shiota, M., Radhika, A., Lin, C., Gannon, M., and Powers, A.C. (2004). Intraislet endothelial cells contribute to revascularization of transplanted pancreatic islets. *Diabetes* **53**:1318-1325.
- Brissova M., Shostak A., Shiota M., Gannon M., Powers A.C. *et al.* (2006) Pancreatic islet production of vascular endothelial growth factor-a is essential for islet vascularization, revascularization, and function. *Diabetes*, **55**: 2974-2985.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin M.Z., Juo, P., Hu, L.S. *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylation and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**:857-868.
- Brunnicardi, F.C., *et al.* (1996) Microcirculation of the Islets of Langerhans. *Diabetes* **45**:385-392.
- Burris, R.E., and Hebrok, M. (2007). Pancreatic innervation in mouse development and beta-cell regeneration. *Neuroscience*.
- Butler A.E., Janson J., Bonner-Weir S., Ritzel R., Rizza R.A., Butler P.C. (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, **52**: 102-110.
- Butler, A.E., Huang, A., Rao, P.N., Bhushan, A., Hogan, W.J., Rizza, R.A., and Butler, P.C. (2007). The replication of beta-cells in normal physiology, in disease and for therapy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **3**:758-768.
- Cabrera, O., Berman, D.M., Kenyon, N.S., Ricordi, C., Berggren, P.-o., and Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *PNAS* **103**:2334-2339.
- Camacho, S.A., Heath, W.R., *et al.* (2001) A key role for ICAM-1 in generating effector cells mediating inflammatory responses. *Nat Immunol* **6**:523-530.
- Cameron, R., Feuer, G. (2000). Apoptosis and its modulation by drugs; Ed. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Campbell I.L., Hobbs M.V., Dockter J., Oldstone M.B.A. and Allison J. (1994) Islet inflammation and hyperplasia induced by the pancreatic islet-specific overexpression of interleukin-6 in transgenic mice. *Am.J. Pathol.*, **145**: 157-166.
- Campbell, S.C., and Macfarlane, W.M. (2002) Regulation of the pdx-1 gene promoter in pancreatic beta-cells. *Biol Bioph Res Commun* **299**:277-284.
- Cao, D., Lin, G., Westphale, E.M.; Beyer, E.C., and Steinberg, T.H. (1997). Mechanisms for the coordination of intercellular calcium signalling in insulin-secreting cells. *J Cell Science* **110**:497:504.
- Carlsson P., Olsson R., Kallstog O., Bodin B., Andersson A., Jansson L. (2002) Glucose-induced islet blood flow increase in rats: interaction between nervous and metabolic mediators. *Am J Physiol Endocrin Metab* **283**: E457-E464
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arterogenesis. *Nat Med* **6**:389-395.
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**:653-660.
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**:932-936.
- Carrillo, J., Puertas, M.C., Alba, A., Ampudia, R.M., *et al.* (2005) Islet-infiltrating B-cells in NOD mice predominantly Target Nervous System Elements. *Diabetes* **54**:68-77
- Casellas, A., Salavert A., Agudo J., Ayuso E., Jimenez V., Moya M., Muñoz S., Franckhauser S. and Bosch F. (2006) Expression of IGF-I in pancreatic islets prevents lymphocytic infiltration and protects mice from type 1 diabetes. *Diabetes*, **55**: 3246-3255.
- Celletti, F.L., Waugh, J.M., Amabile, P.G., Bredolan, A., Hilfiker, P.R., Dake, and M.D. (2001) Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* **7**:425-429.
- Cerf M.E., Muller C.J.F., Du Toit D.F., Louw J., Wolfe-Cooté S.A. (2005) Transcription factors, pancreatic development, and beta-cell maintenance. *Biochem and Biophys Res Comm*, **326**: 699-702.
- Chae, H.Y., Lee, B.W. *et al.* Effective glycemic control achieved by transplanting non-viral cationic liposome-mediated VEGF-transfected islets in streptozotocin-induced diabetic mice. *Exp Mol Med*. **37**(6):513-523.
- Chankiewitz E., Peschke D., Herberg L., Bazwinsky I., Mühlbauer E., Brömme H-J. and Peschke E. (2006) Did the gradual loss of GLUT2 cause a shift to diabetic disorders in the New Zealand Obese mouse (NZO/HI)? *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes*, **114**: 262-269.
- Cheatham B. and Kahn C.R. (1995) Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr. Rev.*, **16**:117-142.
- Chen, K., Fraga, D., Zhang, C., Kotb, M., Gaber, A.O., Guntaka, R.V., and Mahato, R.I. (2004). Adenovirus-based vascular endothelial growth factor gene delivery to human pancreatic islets. *Gene Ther.* **11**:1105-1116.
- Chen L., Thorens B.B., Bonner-Weir S., Weir G.C., Leahy J.L. (1992) Recovery of glucose-induced insulin secretion in a rat model of NIDDM is not accompanied by return of the B-cell GLUT2 glucose transporter gene expression. *Diabetes*, **41**: 1320-1327.
- Chen, M.C., Proost, P., Gysemans, C., Matieu, C., and Eizerik, D.L. (2001) MCP-1 is expressed in pancreatic islets from prediabetic NOD mice and in IL-1 β -exposed human and rat islet cells. *Diabetologia*. **44**:325-332.
- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.*, **162**: 156-159.

- Cirulli, V., Baetens, D., Rutishauer, P.A., Haldan, P.A., Orci, L., and Rouiller, D.G. (1994). Expression of N-CAM in rat islets and its role in islet cell type segregation. *J Cell Sci* **107**:1429-1436.
- Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J.-C., Jörns, A., Lenzen, S., and Eizerik, D.L., (2005). Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes (Suppl)*.
- Colle E. Guttman R.D., Seemayer T. (1981) Spontaneous diabetes mellitus syndrome in the rat. Association with the major histocompatibility complex. *J.Exp.Med.*, **154**: 1237-1242.
- Coulter, L., Chawengsaksophak, K., and Rossant, J. (2005). Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* **438**:937-946.
- Cózar-Castellano I., Takane, K.K., Bottino, R., Balamurugan, A.N., and Stewart A.F. (2004) Induction of beta-cell proliferation and rethioblastoma protein phosphorylation in rat and human islets using adenovirus-mediated transfer of cyclin-dependent kinase-4 and cyclin D1. *Diabetes*, **53**:149-159.
- Cózar-Castellano I., Fiaschi-Taesch N., Bigatel T.A., Takane K.K., Garcia-Ocaña A., Vasavada R. and Stewart A.F. (2006a) Molecular control of cell cycle progression in the pancreatic β -cell. *Endocrine Reviews*, **27**:356-370.
- Cózar-Castellano I., Weinstock, M., Haught, M., Velazquez-Garcia, S., Sipula, D., and Stewart A.F. (2006b). Evaluation of beta-cell replication in mice transgenic for hepatocyte growth factor and placental lactogen: comprehensive characterization of the G1/S regulatory proteins reveals unique involvement of p21cip. *Diabetes*, **55**:70-77.
- Cross, S.E., Richards, S.K., Clark, A., et al. Vascular endothelial growth factor as a survival factor for human islets: effect of immunosuppressive drugs. *Diabetologia*. **50**:1423-1432.
- Dahl U., Sjödin A. and Semb H. (1996) Cadherins regulate aggregation of pancreatic β -cells in vivo. *Development*, **122**: 2895-2902.
- Daniel D. (1994) Epitope specificity cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from the NOD mouse. *Eur.J.Immunol.*, **25**: 1056-1062.
- Daughaday W.H. and Rotwein P. (1989) Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev*, **10**: 68-91.
- Delisser, H.M., Newman, P.J., Albelda, S.M. (1994). Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immuno today* **15**:490-495.
- Deltour L., Leduque P., Paldi A., Ripoché M.A., Dubois P. and Jami J. (1991) Polyclonal origin of pancreatic islets in aggregation mouse chimeras. *Development*, **112**: 115-1121.
- Deltour L., Leduque P., Blume N., Madsen O., et al. (1993) Differential expression of the two nonallelic proinsulin genes in the developing mouse embryo. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **90**: 527-531.
- Devedjian J.C., et al. (2000) Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor-II in beta cells develop type 2 diabetes. *J.Clin.Invest*, **105**: 731-740.
- Di Cosmo B.F., Picarella D. and Flavell R.A. (1994) Local production of human IL-6 promotes insulinitis but retards the onset of insulin-dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Int.Immunol.*, **6**: 1829-37.
- Donath M.Y., Störling J., Maedler K. and Mandrup-Poulsen T. (2003) Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *J Mol Med*, **81**: 455-470.
- Dor, Y., Brown, J., Martinez, O.I., and Melton, D.A. (2004). Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* **429**:41-46.
- Dupont J. and Holzenberger M. (2003) Biology of insulin-like growth factors in development. *Birth Defects Research*, **69**: 257-271.
- Duvillié B., Currie C., Chrones D., Bucchini J., Jami J., Joshi L., Hill J. (2002) Increased islet cell proliferation, decreased apoptosis and greater vascularization leading to β -cell hyperplasia in mutant mice lacking insulin. *Endocrinology* **143**(4):1530-37
- Edlund H. (2001) Developmental biology of the pancreas. *Diabetes*, **50 (Suppl.1)**: S5-S9.
- Elliot, E.A., and Flavell, R.A. (1994). Transgenic mice expressing constitutive levels of IL-2 in islet beta cells develop diabetes. *Int Immunol*. **11**: 1629-37.
- Eizerik, D.L., Sandler, S., Welsh, N., Cetkovic-Cvrlje, M., Nieman, A., Geller, D.A., Pipeleers D.G. (1994). Cytokines suppress human islet function irrespective of their effects on nitric oxide generation. *J Clin Invest* **93**:1968-1974.
- Eizerik, D.L., and Mandrup-Poulsen T. (2001). A choice of death-the signal transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* **44**:2115-2133.
- Elrick, L.J., Docherty, K. (2001). Phosphorylation-dependent nucleocytoplasmic shuttling of Pdx1. *Diabetes* **50**:2244-2252.
- Esni, F., et al. (1999). Neural cell adhesion molecule (N-CAM) is required for cell type segregation and normal ultrastructure in pancreatic islets. *J Cell Biol*. **144**(2):325-37
- Ettinger R.A., Liu A.W., Nepom G.T., Kwok W.W. (1998) Exceptional stability of the HLA-DQA1*0102/DQB1*0602 $\alpha\beta$ protein dimer, the class II MHC molecule associated with protection from insulin-dependent diabetes mellitus. *J.Immunol*, **161**: 6439-6445.

- Ferrara N. (1997) The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Reviews*. **18**: 4-25
- Ferrara N. (2005). The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *EXS* **94**:209-31
- Ferrara N., *et al.* (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. **9**(6):669-76
- Freiesleben De Blasio B., Bak P., Pociot F., Karlsen A.E. and Nerup J. (1999) Onset of Type 1 diabetes: A dynamical instability. *Diabetes*, **48**: 1677-1685.
- Froguel, P., Zoulai, H., Vionnet, N., Velho, G., Vaxillaire, M., Sun, F., *et al.*(1993) Familial hyperglycemia due to mutationa in glucokinase. Definition of a subtype of Diabetes Mellitus. *N Engl J Med* **328**:697-702.
- Froguel, P., and Vehlo, G. (1999). Molecular Genetics of Maturity-onset Diabetes of the Young. *Trends Endocrinol Metab* **10**:142-146.
- Garcia-Ocaña, A., Takane, K.K., Syed, M.A., Philbrick, W.M., Vasavada, R.C. & Stewart, A.F. (2000) Hepatocyte growth factor overexpression in the islet of transgenic mice increases beta cell proliferation, enhances islet mass, and induces mild hypoglycemia. *J. Biol. Chem.* **275**, 1226-1232
- Gauthier B., Brun T., Sarret E.J., Ishihara H., *et al.* (2004) Oligonucleotid microarray analysis reveals that PDX1 as an essential regulator of mitochondrial metabolism in rat islets. *J.Biol.Chem.*, **279**: 31121-31130.
- Geiger, B., and Ayalon, O. (1992). Cadherins. *Annu Rev Cell Biol* **8**:307-332.
- Geng L., Solimena M., Flavell R.A., Sherwin R.S and Hayday A.C. (1998) Widespread expression of an autoantigen-GAD65 transgene does not tolerize non-obese diabetic mice and can exacerbate disease. *PROC.NATL. ACAD.SCI.*, **95**: 10055-10060.
- George, M., Ayuso, E., Casellas, A., Costa, C., Devedjian, J.C. and Bosch, F. (2002) Beta cell expression of IGF-I leads to recovery from Type 1 diabetes. *J Clin Invest*, **109**: 1153-1163.
- Georgia, S., and Bushan, A. (2004). Beta cell replication is the primary mechanism for maintaning postnatal beta-cell mass. *J Clin Invest* **114**:963-968.
- Gerber H.P. *et al* (1998a) VEGF induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1.J. *Biol. Chem.* **273**. 13313-13316.
- Gerber H.P. *et al* (1998b) VEGF regulates endothelial cell survival bt PI3K-Akt signalling pathway. *J. Biol. Chem.* **273**: 30366-30343.
- Gerrish K., Gannon M., Shih D., Henderson E., Stoffel M., Wright C.V.E., and Stein R. (2000) Pancreatic beta cell-specific transcription of the *pdx-1* gene. *J.Biol.Chem.*, **275**: 3485-3492.
- Gianani R. and Eisenbarth G.S. (2005) The stages of type IA diabetes. *Immunol.Rev.*, **204**:232-249.
- Giannoukakis N., Mi Z., Rudert W.A., Gambotto A., Trucco M. and Robbins P. (2000) Prevention of beta cell dysfunction and apoptosis activation in human islets by adenoviral gene transfer of the insulin-like growth factor I. *Gene Therapy*, **7**: 2015-2022.
- Guerrin M. *et al* (1995) VEGF is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. *J. Cell Physiol.* **164**(2):385-94
- Guille H *et al* (2001) Analysis of biological effects and signalling properties of VEGFR-2. *J. Biol. Chem.* **276**:3222-3230
- Goto Y., Kakizaki M., Masaki N. *et al.* (1975) Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats. *Proc.Jpn.Acad.*, **51**: 80-85.
- Greiner D.L., Rossini A.A. and Mordes J.P. (2001) Translating data from animal models into methods for preventing human autoimmune diabetes mellitus: Caveat emptor and primum non nocere. *Clin.Immunol.*, **100**: 134-143.
- Gremlich S., Bonny C., Waeber G., Thorens B. (1997) Fatty acids decreases IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduced GLUT2, glucokinase, insulin and somatostatin levels. *J.Biol.Chem.*, **272**: 30261-30269.
- Grewal I.S., Rutledge, B.J., Wong F.S., Fiorillo, J.A., Gu, L., Flavell R.A., and Rollins, B.J. (1997)transgenic MCP-1 in pancreatic islets produces monocyte-rich insulinitis without diabetes.. *J.Immol.*, **159**: 401-408.
- Grupe, A., Arnush, M., Sawyer, S.P., and Sarvetnick, N. (1995). Transgenic knockouts reveal a critical requirement for pancreatic beta cell glucokinase in maintaning glucose homeostasis. *Cell* **83**:69-78.
- Guillam M.T., Hümmeler E., Schmidt A., Dériaz N., Thorens B. *et al.* (1997) Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islets development in mice lacking GLUT2. *Nat.Genet.*, **17**: 327-220.
- Gunton J.E., Kulkarni R.N., Yim S., Kahn R.C., *et al.* (2005) Loss of *ARNT/HIF1β* mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human Type 2 diabetes. *Cell*, **122**: 337-349.
- Habener J.F., Kemp D.M. and Thomas M.K. (2005) Minireview:Transcriptional Regulation in Pancreatic Development. *Endocrinology*, **146**:1025-1034.
- Haefen T.W., Twickler Th.B. (2004) Insulin-like growth factors and pancreas beta cells. *European Journal of Clinical Invest.*, **34**: 249-255.

- Halban, P. A. (2004a). Cellular sources of new pancreatic beta-cells and therapeutic implications for regenerative medicine. *Nat Cell Biol.* **6**:1021-1025.
- Halban, P.A. (2004b). Towards a perfect beta-cell replacement. *Semin Cell Dev Biol* **15**: 325-326.
- Hanafusa T., Fujino-Kurihara H., Miyazaki A., Yamada K., Nakajima H., Miyagawa J., Kono N. and Tarui S. (1987) Expression of class II major histocompatibility complex antigens on pancreatic B cells in the NOD mouse **30**: 104-108.
- Harris P.E., Malanga D., Liu Z., Hardy M.A., Souza F., Del Pozzo G., Winchester R.J. and Maffei A. (2006) Effect of interferon alpha on MHC class II gene expression in ex vivo human islet tissue. *Biochimica et Biophysica Acta.*, **1762**: 627-635.
- Hauge-Evans AC, Squires PE, Persaud SJ, Jones PM. (1999) Pancreatic beta-cell-to-beta-cell interactions are required for integrated responses to nutrient stimuli: enhanced Ca²⁺ and insulin secretory responses of MIN6 pseudoislets. *Diabetes*, **48(7)**:1402-8.
- Haverkos H.W. (1997) Could the etiology of IDDM be multifactorial? *Diabetologia*, **40**: 1235-1240.
- Hayakawa H., Kawarada Y., Mizumoto R., Hibasami H., Tanaka M. and Nakashima K. (1996) Induction and involvement of endogenous IGF-I in pancreas regeneration after partial pancreatectomy in the dog. *J.Endocrinol.*, **149**: 259-267.
- Heit, J.J., Karnik, S.K., and Kim, S.K. (2006). Intrinsic regulators of pancreatic beta-cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **22**:311-338.
- Heller, B., Wang, Z-Q., et al. (1995). Inactivation of the poly(ADP-ribose)polymerase gene affects oxygen radical and nitric oxide toxicity in islet cells. *J Biol Chem* **270**:11176-11180.
- Herr R.R., Jahnke A.D., Argoudelis A.D.(1967) The structure of Streptozotocin. *J.Am.Chem.Soc.*, **89**: 4808-09.
- Higuchi Y., Herrera P., Muniesa P., et al. (1992) Expression of a tumor necrosis factor α transgene in murine pancreatic beta-cells results in severe and permanent insulinitis without evolution towards diabetes. *J.Exp.Med.*, **176**: 1719-1731.
- Hogg J., Han V.K.M., Clemmons D.R. and Hill D.J. (1993) Interactions of nutrients, insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in the regulation of DNA synthesis by isolated fetal rat islets of Langerhans. *J.Endocrinol.*, **138**: 401-412.
- Holst, L.S., Mulder, H., Manganiello, V., Sundler, F., Ahren B., Holm C., and Degerman, E. (1998). Protein Kinase B is expressed in pancreatic beta cells and activated upon stimulation with IGF-I. *Biochem Biophys Res Commun* **250**:181-186.
- Homo-Delarche F., Calderari S., Halban P., Portha B., Serradas P., et al. (2006) Islet inflammation and fibrosis in a spontaneous model of type 2 diabetes, the GK rat. *Diabetes*, **55**: 1625-1633.
- Hoorens, A., Pipeleers, D. (1999). Nicotinamide protects human beta cells against chemically-induced necrosis, but not against cytokine-induced apoptosis. *Diabetologia* **42**:55-59.
- Houck K.A., et al (1992) VEGF bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* **267**:26031-20637
- Hui, H., Dotta, F., Di Mrio, U., and Perfetti, R. (2004). Role of caspases in the regulation of apoptotic pancreatic islet beta-cells death. *J Cell Physiol* **200**:177-200.
- Huopio H., Shyng S.L., Otonkoski T., Nichols C.G. (2002) K(ATP) channels and insulin secretion disorders (Review). *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* **283**: E207-E216.
- Imagawa A, Hanafusa T., Tamura S., Moriwaki M., et al. (2001) Pancreatic biopsy as a procedure for detecting in situ autoimmune phenomena in type 1 diabetes. Close correlation between serological markers and histological evidence of cellular autoimmunity. *Diabetes*. **50**: 1269-1273.
- Itoh N., Hanafusa T., Miyazaki A., Miyagawa J., Yamagata K., Yamamoto K., Waguri M., Imagawa A. et al. (1993) Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J.Clin.Invest.*, **92**: 2313-2322.
- Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.J. (2003) Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 3ª edición, Masson, Barcelona.
- Johanson, M., Mattson, G., Andersson, A., Jansson, L., Carlsson, P.O. (2006). Islet endothelial cells and pancreatic beta-cell proliferation: studies in vitro and during pregnancy in adult rats. *Endocrinology*. **147(5)**:2315-2324.
- Johnson J.H., Ogawa A., Chen L., Orci L., Unger R.H. et al. (1990) Underexpression of beta-cell high K_m glucose transporters in non-insulin-dependent diabetes. *Science*, **250**: 546.
- Jonas J-C., Sharma A., Hasenkamp W., Ilkova H., Patane G., Laybutt R., Bonner-Weir S., Weir G.C. (1999) Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J.Biol.Chem.*, **274**: 1447-1457.
- Jones J.I., Doerr M.E. and Clemmons D.R. (1995) Cell migration: Interactions among integrins, IGFs and IGF-BPs. *Prog Growth Factor Res*, **6**: 319-327.
- Jonsson J., Carlsson L., Edlund T, Eldlund H. (1994) Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*, **371**: 606-609.
- Kahn C.R. (1985) The molecular mechanism of insulin action. *Ann.Rev.Med.*, **36**: 429-251.
- Kahn S.E. (2001) Clinical Review 135. The importance of beta-cell failure in the development and progression of Type 2 Diabetes. *J.Clin.Endocrinol. & Metab*, **86(9)**: 4047-4058.

- Kaido, T., Yerba, M., Cirulli, V., Rhodes, C., Diaferia, G., and Montgomery, A.M. (2006). Impact of defined matrix interactions on insulin production by cultured human beta-cells. *Diabetes* **55**:2723-2729.
- Kamba, T., Betty, Y.Y., Hashizume, H., *et al.* (2005) VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**:H560-H576.
- Kaneto H., Xu G., Nobuharu F., Kimi S., Bonner-Weir S. and Weir G.C. (2002) Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *J.Biol. Chem.*, **277**: 30010-30018.
- Kauffmann-Zeh A., Rodriguez-Viciano P., Ulrich E., Gilbert C., Coffey P., Downward J. and Evan G. (1997) Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signaling through PI(3)K and PKB. *Nature*, **385**: 544-548.
- Kawamori D., Kajimoto Y., Kaneto H., *et al.* (2003) Oxidative stress induces nucleo-cytoplasmic translocation of pancreatic transcription factor PDX-1 through activation of c-Jun NH₂-terminal kinase. *Diabetes*, **52**: 2896-2904.
- Kido Y., Burks D.J., Withers D., Bruning J.C., Kahn C.R., White M.F. & Accili D. (2000) Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest*, **105**:199-205.
- Kitamura, T., Nakae, J., Kitamura, Y., *et al.* (2002). The Forkhead transcription factor FoxO1 links insulin signalling to Pdx1 regulation of pancreatic beta cell growth. *J Clin Invest*. **110**:1839-1847.
- Konstantinova, I., and Lammert, E. (2004). Microvascular development: learning from pancreatic islets. *Bioessays*. **26**:1069-1075.
- Kreis, T. (1993). Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Krysa, J., and Steger, A. (2007). Pancreas and Cystic Fibrosis: the implications of increased survival in Cystic Fibrosis. *Pancreatology* **7**:447-450.
- Kulkarni R.N. *et al.* (1999) Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic β cells creates an insulin secretory defect similar to that in Type 2 diabetes. *Cell*, **96**: 329-339.
- Kulkarni R.N. *et al.* (2002) Beta-cell specific deletion of the Igf1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter beta-cell mass. *Nat.Genet.*, **31**: 111-115.
- Kulkarni R.N., Jhala U.S., Winnay J.N., Krajewski S., Montminy M. and Kahn R.C. (2004) PDX-1 haploinsufficiency limits the compensatory islet hyperplasia that occurs in response to insulin resistance. *J.Clin.Invest.*, **114**: 282-836.
- Kulkarni R.N. & Kahn R. (2004) HNFs—linking the liver and pancreatic islets in diabetes. *Science*, **303**: 1311-1312.
- Kulkarni R.N. (2005). New insights into the roles of insulin/IGF-I in the development and maintenance of beta-cell mass. *Rev Endron & Metab Disorders* **6**:199-210.
- Kushner, J.A. (2006). Beta-cell growth: an unusual paradigm of organogenesis that is cyclin D2/Cdk4 dependent. *Cell Cycle*. **5**:234-237.
- Kushner, J.A., Ciemerych, M.A., Sicinska, E., Wartschow, L.M., Teta, M., Long, S. Y., Sicinski, P., and White, M.F. (2005). Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth. *Mol Cell Biol*. **25**:3752-3765.
- Kutlu, B., Darville, M.I., Cardozo, A.K., and Eizerik, D.L. (2003). Molecular regulation of MCP-1 expression in pancreatic beta-cells. *Diabetes* **52**:348-355.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lammert, E., Cleaver, O., and Melton, D. (2001) Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* **294**:564-7
- Lammert, E., Cleaver, O., Melton, D. (2003a) Role of endothelial cells in early pancreas and liver development. *Mech.of Develop.* **120**:59-64
- Lammert E., Gu, G., McLaughlin, M., Brown, D., Brekken, R., Murtaugh, L.C., Gerber, H.P., Ferrara, N., and Melton D. (2003b) Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. *Current Biology* **13**:1070-4.
- Lantz K.A., Vatamaniuk M.Z., Matschinsky F.M., Kaestner K.H., *et al.* (2004) *Foxa2* regulates multiple pathways of insulin secretion. *J.Clin.Invest.*, **114**: 512-520.
- Laybutt D.R., Kaneto H., Hasenkamp W., Ferran C., Bonner-Weir S., Sharma A., Weir G.C., *et al.* (2002) Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to beta-cell survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes*, **51**: 213-223.
- Laybutt D.R., Glandt M., Xu G., Ahn Y.B., Trivedi N., Bonner-Weir S. and Weir G.C. (2003) Critical reduction in β -cell mass results in two distinct outcomes over time. *J.Biol.Chem.*, **278**(5): 2997-3005.
- LeCouter, J., *et al.* (2003). Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* **299**:890-893.
- Le Roith D. (1997) Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med*, **336**: 633-640.
- Lee, C.G., Link, H., Baluk, P., *et al.* (2004). Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhancing Th2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med* **10**:1095-1103.
- Lee C.S., Sund N.J., Vatamaniuk M.Z., Matschinsky F.M., Stoffers D.A. and Kaestner K.H. (2002) *FoxA2* controls *Pdx1* gene expression in pancreatic beta-cells in vivo. *Diabetes*, **51**: 2546-2551.

- Li, X., Zhang, L., Meshichi, S., Dias-Leme, C., Raffin, D., Johnson, J.D., Treutelaar, M.K., and Burant, C.F. (2006). Islet microvasculature in islet hyperplasia and failure in a model of type 2 diabetes. *Diabetes* **55**:2965-2973.
- Like A.A. and Rossini A.A. (1976) Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: New model of diabetes mellitus. *Science*, **193**: 415-417.
- Lingohr M.K., Dickson L.M., McCuaig J.F., Hugl S.R., Twardzik D.R., Rhodes C.J. (2002) Activation of IRS-2-mediated signal transduction by IGF-1, but not TGF- α or EGF, augments pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes*, **41**: 966-976.
- Lingohr, M.K., Briaud, I., Dickson, L.M., McCuaig, J.F., Alarcon, C., Wiscksteed, B.L., and Rhodes, C.J. (2006). Specific regulation of IRS2 expression by glucose in rat primary pancreatic islet beta-cells. *J Biol Chem* **281**(23):15884-92.
- Linn T., Schneider K., Hammes H.P., Preissner K.T. (2003) Angiogenic capacity of endothelial cells in islets of Langerhans. *FASEB J.* **17** (8): 881-883
- Lowe, W.L. (1998) Chapter 47: Diabetes Mellitus. Principles of Molecular Medicine. J.L.Jameson ed.
- Lu Y., Herrera P., Guo Y., Sun, D., Tang, Z., LeRoith, D, and Liu, J.L. (2004). Pancreatic-specific inactivation of IGF-I gene causes enlarged pancreatic islets and significant resistance to diabetes. *Diabetes* **53**:3131-3141.
- Lukic M.L., Stosic-Grujicic S. and Shahin A. (1998) Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Dev.Immunol.*, **6**:119-128.
- Mabley J.G., Belin V., John N. and Green I.C. (1997) Insulin-like growth factor I reverses interleukin-1 β inhibition of insulin secretion, induction of nitric oxide synthase and cytokine-mediated apoptosis in rat islets of langerhans. *FEBS Lett.*, **417**: 235-238.
- Mackay, C.R. (2001). Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* **2**:95-101.
- Mackie, A.D.R. ; Thornton, S.J., and Edenborough, F.P. (2003). Cystic fibrosis-related diabetes. *Diabet Med* **20**:425-436.
- Maclean N., Ogilvie R.F. (1995) Quantitative estimation of the pancreatic islet tissue in diabetic subjects. *Diabetes*, **4**: 367-376.
- Maedler K., Spinass G.A., Lehmann R. *et al.* (2001) Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes*, **50**: 1683-1690.
- Maedler K., Sergeev P., Ris F., Donath M.Y. *et al.* (2002) Glucose-induced beta cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J.Clin.Invest.*, **110**: 851-860.
- Makino S., Kunitomo D., Muraok D., Mizushima Y., Katagiri K. and Tochino Y. (1980) Breeding of non-obese, diabetic strain of mice. *Exp.Anim.*, **29**: 1-13.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci.* **30**: 630-641.
- Mandrup-Poulsen T. (2003) Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochemical Pharmacology*, **66**:1433-1440.
- Massague J. and Czech M.P. (1982) The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. *J Biol Chem*, **257**: 5038-5045.
- Mathis D., Vence L. and Benoist, C. (2001) Beta-cell death during progression to diabetes. *Nature*, **414**: 792-798.
- Matsumoto, K., Yositomi, H., Rossant, J., and Zaret, K.S. (2001). Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* **294**:559-563.
- Mattson, G., Danielson, A., Kriz, Carlsson, P.O., and Jansson, L. (2007) Endothelial cells in endogenous and pancreatic islets: Differences in the expression of angiogenic peptides and receptors. *Pancreatology*
- Means, A.L., Ray, K.C., Singh, A.B., Washington, M.K., Whitehead, R.H., Harris, R.C. Jr, *et al.* (2003). Overexpression of heparin-binding EGF-like growth factor in mouse pancreas results in fibrosis and epithelial metaplasia. *Gastroenterology*. **124**(4):1020-36.
- Meier, J.J., Lin, J.C., Butler, E.A., Galasso, R., Martinez, D.S., and Butler, P.C. (2006). Direct evidence of attempted beta cell regeneration in an 89-year-old patient with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia*. **49**:1838-1844.
- Menger M.D., Vajkoczy P., Berger C., Messmer K. (1994) Orientation of microvascular blood flow in pancreatic islet isograft. *J Clin Invest.* **93** (5): 2280-5.
- Mesah-Brown, E., Shahin, A., Parekh, K., Hakim, A.A., Shamisi, M.A., Hsu, D.K., and Lukic, M.L. (2006). Functional capacity of macrophages determines the induction of type 1 diabetes. *Ann NY Acad Sci* **1084**:49-57.
- Miele, C., Rochford, J.J., Filippa, N., Giorgetti-Peraldi, S., and Van Obberghen, E. (2000). Insulina and IGF-i induce VEGF mRNA expression via different pathways. *J Biol Chem*. **275**: 21695-21702.
- Minchenko A. *et al* (1994) hypoxic stimulation of VEGF stimulation. *Lab. Invest.* **71**, 374-379
- Moller D.E., Yokota A., Caro J.F., and Flier J.S. (1989) Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol. Endocrinol*, **3**:1263-1269.

- Montanya, E., Nacher, V., Biarnés, M., Soler, J. (2000). Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout life in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes*, **49**:1341-1346.
- Montanya, E. (2001). El trasplante de islotes de páncreas como terapia en la diabetes tipo 1. *Endocrinología y Nutrición*:1-2.
- Morrione, A., et al. (1997) Insulin-like growth factor II stimulates cell proliferation through the insulin receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **94**: 3777–3782.
- Motzo C., Contu D., Cordell H., Lampis R., Congia M., Marrosu M.G., Todd J.A., et al. (2004) Heterogeneity in the magnitude of the insulin gene effect on HLA risk in type 1 diabetes. *Diabetes*, **53**: 3286-3291.
- Mueller R., Krahl T. and Sarvetnick N. (1996) Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *J.Exp.Med.*, **184**: 1093-1099.
- Muller, W.A., Weigl, S.A., Deng, X., Phillips, D.M. (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* **178**:449-460.
- Murdoch, C., and Finn, A. (2000). Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious disease. *Blood* **95**:3032-43.
- Myers M.A., Mackay I.R., Rowley M.J. and Zimmet P.Z. (2001) Dietary microbial toxins and type 1 diabetes – a new meaning for seed and soil. *Diabetologia*, **44**: 1199-1200.
- Nakae, J., Biggs III, W.H., Kitamura, T., Cavenee, W.K., Wright, C.V.E., Arden, K.C., and Accili, D. (2002). Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nat Gen* **32**:245-253.
- Nakhooa A.F., Like A.A., Chappel C.I., Murray F.T., Marliss B. (2001) The spontaneously diabetic Wistar rat: metabolic and morphologic studies. *Diabetes*, **26**: 100-112.
- Naya F.J., Stellrecht C.M.M., Tsai M-J. (1995) Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev*, **9**:1009-1019.
- Nepom G.T., Kwok W.W. (1998) Molecular basis for HLA-DQ associations with IDDM. *Diabetes*,**47**:1177-84.
- Nikolova, G., Jabs, N., Konstantinova, I., Domogatskaya, A., tryggvason, K., Sorokin, L., et al. (2006). The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and Beta cell proliferation. *Dev Cell*. **10**:397-405.
- Nikolova, G., Strilic, B., and Lammert, E. (2007). The vascular niche and its basement membrane. *Trends Cell Biol*. **17**:19-25.
- Nir, T., Melton, D.A., and Dor, Y. (2007) Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration. *J Clin Invest*. **117**: 2553-2561.
- Nishino H., Ozaka K., Takeishi M., Watanabe Y. (1985) Pancreatic microcirculation in rats (in particular in islet) *Microcirc. Annual*. pp.325-337
- Notkins A.L. and Lernmark A. (2001) Autoimmune type 1 diabetes: Resolved and unresolved issues. *J.Clin.Invest.*, **108**: 1247-1252.
- Oberg-Welsh C., Sandler S., Andersson A., Welsh M. (1997) Effects of vascular endothelial growth factor on pancreatic duct replication and the insulin production of fetal islet-like cell clusters in vitro. *Mol. and Cel. Endocr.***126**:125-32
- O'Brien B.A., Harmon B.V., Cameron D.P. and Allan D.J. (1996) Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *J.Pathol.*, **178**: 176-181.
- Odom D.T., Zizlsperger N., Gordon B., Bell G.W., Young R.A., et al. (2004) Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science*, **303**: 1378-1381.
- Offield M.F., Ray M., Stein R., Magnuson M.A., Wright C.V.E., et al. (1996) PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development*, **122**: 983-995.
- Ohlsson H., Thor S and Eldund T. (1991) Novel insulin promoter- and enhancer-binding proteins that discriminate between pancreatic alpha- and beta-cells. *Molecular Endocrinology*, **5**:897-904.
- Okamoto, H., Hribal, M.L., Lin, H.V., bennett, W.R., Ward, A., and Accili, D. (2006). Role of the forkhead protein FoxO1 in beta cell compensation to insulin resistance. *J Clin Invest*. **116**: 775-782.
- Olsson, R., and Carlsson, P.O. (2006). The pancreatic islet endothelial cell: emerging roles in islet function and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. **38**:710-714.
- Orci L., Ravazzola M., Baetens D., Unger R.H. et al. (1990)(b) Evidence that down-regulation of beta-cell glucose transporters in non-insulin-dependent diabetes may be the cause of diabetic hyperglycemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, **87**: 9953-9957.
- Orci L., Unger R.H., Ravazzola M. et al. (1990) (a) Reduced beta-cell glucose transporter in new onset diabetic BB rats. *J.Clin.Invest.*, **86**: 1615-1622.
- Palmer J.P. (1987) Insulin autoantibodies: their role in the pathogenesis of IDDM. *Diabetes Metab.Rev.*, **3**: 1005-1015.
- Papaccio, G., Pisanti, F.A., Montefiano, R.D., Granziano, A., and Latronico, M.V. (2002). Th1 and Th2 cytokines exert regulatory effects upon islet microvascular areas in NOD mouse. *J Cell Biochem* **86**(4):651-64.
- Paquette J., Giannoukakis N., Polychronakos C., Vafiadis P. and Deal C. (1998) The *INS* 5' variable number of tandem repeats is associated with *IGF2* expression in humans. *J.Bio.Chem.*, **273**: 14158-14164.

- Paris, M., Bernard-Kargar, C., Brthault, M., Bouwens, L., and Ktorza, A. (2003). Specific and combined effects of insulin and glucose on functional pancreatic beta-cell mass in vivo in adult rats. *Endocrinology* **144**(6):2717-2727.
- Park, C., Kim, J.R., Shim, J.K., Kang, B.S., Park, Y.G., Nam, K.S., Lee, Y.C., and Kim, C.H. (1999). Inhibitory effects of Streptozotocin, TNF- α , and IL-1 β on glucokinase activity in pancreatic islets and gene expression of GLUT2 and Glucokinase. *Arch Bioch Bioph* **15**:217-224.
- Park, J.E., *et al.* (1993). VEGF: differential deposition into the subepithelial extra-cellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol. Biol. Cell.* **4**, 1317-1326
- Patti M.E. and Kahn C.R. (1998) The insulin receptor – a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J.Basic Clin. Physiol.Pharmacol.*, **9**: 89-109.
- Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **29**: e45.
- Picarella D.E., Kratz A., Li C., Ruddle N.H. and Flavell R.A. (1993) Transgenic tumor necrosis factor (TNF)- α production in pancreatic islets leads to insulinitis, not diabetes: Distinct patterns of inflammation in TNF- α and TNF- β transgenic mice. *J.Immunol.*, **150**: 4136-4150.
- Pick A., Clark J., Kubstrup C., Pugh W., *et al.* (1998) Role of apoptosis in failure of beta cell mass compensation for insulin resistance and β cell defects in the male Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *Diabetes*, **47**: 358-364.
- Pickup J.C., Crook M.A. (1998) Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia*, **41**: 1241-1248.
- Pickup J. & Williams G. (2003) *Textbook of Diabetes, 3rd edition, Volum 1.* Series editor Blackwell Science Ltd.
- Pietropaolo M., Barinas-Mitchell E., Pietropaolo S.L., Kuller L.H. and Trucco M. (2000) Evidence of islet cell autoimmunity in elderly patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, **49**:32-38.
- Pietropaolo M., Barinas-Mitchell E., and Kuller L.H. (2007) The heterogeneity of Diabetes: unrevealing a dispute: is systemic inflammation related to islet autoimmunity?. *Diabetes*, **56**:1189-1197.
- Poitout V., Stein R., Rhodes c.J. (2004) Insulin Gene Expression and Biosynthesis. Chapter 6: 97-123. *International Textbook of Diabetes Mellitus, Third Edition, Volum 1.* Edited by R.A. DeFronzo, E. Ferrannini, H.Keen and P.Zimmet. John Wiley & Sons, Ltd.
- Puigserver P., Rodgers J.T. (2006) Foxa2, a novel transcriptional regulator of insulin sensitivity. *Nature Medicine*, **12** (1): 38-39.
- Punglia, R.S., Lu, M., Hsu, J., Kurodi, M., Tolentino, M.J., *et al.* (1997). Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor I. *Diabetes* **46**:1619-1626.
- Rabinovitch A., Quigley C., Russell T., Patel Y. and Mintz D.H. (1982) Insulin and multiplication stimulating activity (an insulin-like growth factor) stimulate islet beta-cell replication in neonatal rat pancreatic monolayer cultures. *Diabetes*, **31**:160-164.
- Rabinovitch A. (1998) An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab.Rev.*, **14**: 129-151.
- Rabinovitch A.& Suarez-Pinzon W.L. (2003) Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, **4**: 291-299.
- Rabinovski, E.D., Gelir, E., Gelir, S., Lui, H., Kattash, M., Demayo, F.J., Shenaq, S.M., and Aschwatz, R.J. (2003). Targeted expression of IGF-1 transgene to skeletal muscle accelerates muscle and motor neuron regeneration. *FASEB J.* **17**:53-55.
- Rane, S.G., Dubus, P., Mettus, R.V., Galbreath, E.J., Boden, G., Reddy, E.P., and Barbacid, M. (1999). Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nat Genet.* **22**: 44-52.
- Reddy S., Young M., Poole C.A. and Ross J.M. (1998) Loss of glucose transporter-2 precedes insulin loss in the Nonobese Diabetic and the Low-Dose streptozotocin mouse models: a comparative immunohistochemical study by light and confocal microscopy. *General and Comparative Endocrinology*, **111**: 9-19.
- Ricordi C., Strom T., *et al.* (2003) Clinical islet transplantation: advances and immunological challenges. *Nature Reviews* **4**:259-68.
- Roberts, W.G., Palade, G.E., *et al.* (1995) Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by VEGF. *J. Cell Sci.* **108**:2369-2379
- Robertson R.P. (2006) Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes. *Current opinion in Pharmacology*, **6**: 1-5.
- Rodriguez, S., Gaunt, T.R., and Day, I.N.M. (2007). Molecular genetics of human growth hormone, insulin-like growth-factors and their pathways in common disease. *Hum Genet* **122**:1-21.
- Roman, I., Schuit, F., and Bouwens, L. (1997) Effect of vascular endothelial growth factor on growth and differentiation of pancreatic ductal epithelium. *Lab. Invest.* **76**(2):225-32.
- Rosen C.J. (1999) Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins: clinical implication. *Clin.Chem.*, **45**: 1384-1390.
- Rossini A.A., Appel M.C., Williams R.M. and Like A.A. (1977) Genetic influence of the streptozotocin- induced insulinitis and hyperglycemia. *Diabetes*, **26**: 916-920.
- Rother K.I., Accili D. (2000) Role of insulin receptors and IGF receptors in growth and development. *Pediatr.Nephrol.*, **14**: 558-561.

- Rotwein P., Yokoyama S., Didier D.K., Chirgwin J.M. (1986) Genetic analysis of the hypervariable region flanking the human insulin gene. *Am.J.Hum.Genet.*, **39**: 291-299.
- Salavert, A (tesi doctoral, 2007). Estudi en animals transgènics del paper de la sobreexpressió d'IGF-II en cèl·lula β en el desenvolupament de diabetis mellitus.
- Saltiel A.R. and Kahn C.R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, **414**: 799-806.
- Samaras S.E., Cissell, K., Gerrish, C.V., Wright, M., Gannon, M., and Stein R. (2002) Conserved sequences in a tissue-specific regulatory region of the pdx1-gene mediate transcription in pancreatic beta cells: Role for HNF3 β and pax6. *Mol Cell Biol.*, **22**:4702-4713.
- Sander M., and German M.S. (1997) The beta cell transcription factors and development of the pancreas. *J.Mol.Med.*, **75**: 327-340.
- Sarvetnick N., Shizuru J., Liggitt D., Martin L., McIntyre B., Gregory A., et al. (1990) Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta-cell expression of interferon-gamma. *Nature*, **346**: 844-847.
- Sawano, A., Iwui, S., Sakuri, Y., Ito, M., Nakahata, T., and Shibuya, M. (2001). Flt-1, VEGF receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages. *Blood* **97**:785-791.
- Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Ricke D, Purcell S., et al. (2007) Genome-Wide Association Analysis Identifies Loci for Type 2 Diabetes and Triglyceride Levels. *Science*, **26**:
- Shalaby, F. et al. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**:62-65.
- Shin, I., Yakes, F.M., Rojo, F., Shin, N., Bakin, A.V., Baselga, J., and Arteaga, C.L. (2002). PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27kip1 at threonine 157 and modulation of its cellular localisation. *Nat Med.* **8**:1145-1152.
- Schmid-Schönbein, G.W. (2006). Analysis of inflammation. *Ann Rev Biomed Eng* **8**:93-151.
- Schnedl W.J., Ferber S., Johnson J.H. and Newgard C.B. (1994) STZ transport and cytotoxicity. specific enhancement in GLUT2- expressing cells. *Diabetes*, **43**: 1326-1333.
- Schneeberger, E.E., and Lynch, R.D. (1992). Structure, function and regulation of cellular tight junction. *Am J Physiol* **262**:647-661.
- Schrezenmeir J. and Jagla A. (2000) Milk and diabetes. *J.Am.Coll.Nutr.*, **19**: 176S-190S.
- Schröppel, B., Zhang, N., Chen, P., Zhang, W., et al. (2004). Differential expression of chemokines and chemokine receptors in murine islet allografts: the role of CCR2 and CCR5 signalling pathways. *J Am Soc Nephrol* **15**:1853-1861.
- Schröppel, B., Zhang, N., Chen, P., Zhang, W., et al. (2004). Role of Donor-derived MCP-1 in murine islet transplantation. *J Am Soc Nephrol* **16**:444-451.
- Seino S., Seino M., Nishi S., Bell G.I. (1989) Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **3**: 114-118.
- Servitja J.M. and Ferrer J. (2004) Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function. *Diabetologia*, **47(4)**: 597-613.
- Shieh S-Y., Tsai M-J. (1991) Cell-specific and ubiquitous factors are responsible for the enhancer activity of the rat insulin II gene. *J.Biol.Chem.*, **266**: 16708-16714.
- Shih D.Q., Heimesaat M., Kuwajima S., Stein R., Wright C.V., Stoffel M. (2002) Profound defects in pancreatic beta-cell function in mice with combined heterozygous mutations in Pdx-1, Hnf-1alpha and Hnf-3beta. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **99 (6)**: 3818-3823.
- Sigrist, S., Mechine-Neuville, A., et al. (2003) Influence on the viability of encapsulated pancreatic rat islets after transplantation in diabetic mice. *Cell Transpl.* **12(6)**:627-635.
- Smith F.E., Rosen K.M., Villa-Komaroff L., Weir G.C. & Bonner-Weir S. (1991) Enhanced insulin-like growth factor I gene expression in regenerating rat pancreas. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **88**: 6152-6156.
- Soker S. et al (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial cells as an isoform-specific receptor for VEGF. *Cell* **92**, 735-745
- Somoza N., Vargas F., Roura-Mir C. et al. (1994) Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus: changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V beta usage, and cytokine profile. *J.Immunol.*, **153**: 1360-1370.
- Sondel, M., et al. (1999) VEGF has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation *J. Neurosci.* **19**: 5731-5740.
- Song, W.W., and Ergul, A. (2006). Type-2 diabetes-induced changes in vascular extracellular matrix gene expression. *Cardiov Diabetol* **5**:3.
- Spranger J., Kroke A., Mohlig M. et al. (2003) Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Postdam Study. *Diabetes*, **52**: 812-817.
- Stappert, J., Kemler, R., (1993). Intracellular associations of adhesion molecules. *Curr Opin Neurob* **3**:60-66.
- Starborg M., Gell K., Brundell E., Hogg C. (1996) The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J.Cell.Sci.*, **109**: 143-153.

- Steiner D.F., Bell G.I., Tager H.S. (1989) *Endocrinology*, p.1263. Series Editor W.B. Saunders, Philadelphia.
- Stoffers D.A., Zink N.T., Stanojevic V., Clarke W.L., Habener J.F. (1997) Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF-1. *Nature Genet.*, **17**: 138-139.
- Sunami, E., Kanazawa, H., Hashizume, H., Takeda, M., Hatekeyama, K., and Ushiki, T. (2001). Morphological characteristics of Schwann cells in the islet of Langerhans of the murine pancreas. *Arch Histol Cytol.* **64**(2):191-201.
- Sund N.J., Vatamaniuk M.Z., Casey M., Ang S-L. *et al.* (2001) Tissue-specific deletion of *Foxa2* in pancreatic beta-cells results in hyperinsulinemic hypoglycemia. *Genes & Development*, **15**:1706-1715.
- Syed M.A., Barinas-Mitchell E., Pietropaolo S.L. *et al.* (2002) Is type 2 diabetes a chronic inflammatory/autoimmune disease? *Diabetes Nutr.Metab.*, **15**: 68-83.
- Tamemoto H., *et al.* (1994) Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*, **372**: 182-186.
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., and Khan, R.C. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**:86-96.
- Terauchi, Y., Sakura, H., Yasuda, K., Iwamoto, K., Tekahashi, N., *et al.* (1995). Pancreatic beta-cell-specific targeted disruption of glucokinase gene. Diabetes mellitus due to defective insulin secretion to glucose. *J Biol Chem.* **270**:30253-30256).
- Teta, M., Rankin, M.M., Long, S.Y., Stein, G.M., and Kushner, J.A. (2007). Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors. *Cell Dev.* **12**: 817-826.
- Teta, M., Long, S.Y., Wartschow, L.M., Rankin, M.M., and Kushner, J.A. (2005). Very slow turn-over of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes.* **54**:2557-25567.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (1997) Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, **20**: 1183-1197.
- Thorens B., Wu Y.J., Leahy J.L., Weir G.C. (1992) The loss of GLUT2 expression by glucose unresponsive beta cells of db/db mice is reversible and is induced by the diabetic environment. *J.Clin.Invest.*, **90**: 77-85.
- Todd J.A., Farrall M. (1996) Panning for gold: genome-wide scanning for linkage in type 1 diabetes. *Hum. Mol.Genet.*, **5**: 1443-1448.
- Tokuyama, Y., Sturis, J., DePaoli, A.M. *et al.* (1995) Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes*, **44** (12): 1447-1457.
- Tuttle, R.L., Gill, N.S., Pugh, W., Lee, J.P., Koeberlein, B., Furth, E.E., Polonsky, K.S., Naji, A., and Birnbaum, M.J. (2001). Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha. *Nat Med.* **7**:1133-1137.
- Uchida, T., Gill, N.S., *et al.* (2005). Deletion of *Cdkn1b* ameliorates hyperglycemia by maintaining compensatory hyperinsulinemia in diabetic mice. *Nat Med.* **11**:175-182.
- Ueki K., Okada T., Hu J., Kahn R.C., Kulkarni R.C., *et al.* (2006) Total insulin and IGF-I resistance in pancreatic beta-cells causes overt diabetes. *Nat.Genet.*, **38**: 583-586.
- Unemori E.N., *et al.* (1992) VEGF induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* **153**: 557-562
- Unger R.H. (1991) Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells. *Science*, **251**: 1200-1205.
- Valera A, Solanes G, Fernández-Alvarez J, Pujol A, Ferrer J, Asins G, Gomis R, and Bosch F (1994) Expression of GLUT-2 antisense RNA in beta cells of transgenic mice leads to diabetes. *J Biol Chem.* **269**(46):28543-6.
- Verge C.F., Gianani R., Kawasaki E., Yu L., Pietropaolo M., Jackson R.A. *et al.* (1996) Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*, **45**: 926-933.
- Verges c.F., Gianani R., Kawasaki E., Yu L., Pietropaolo M., Jackson R.A. *et al.* (1996) Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*, **45**: 926-933.
- Viglietto, G., Motti, M.L., Bruni, P., Melillo, R.M. *et al.* (2002). Cytoplasmic relocalisation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1) by Pkb/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med.* **8**:1136-1144.
- Visse, R., and Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* **92**(8):827-839
- Waeber G., Thomson N., Nicod P., Bonny C. (1996) Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Molecular Endocrinology*, **10**:1327-1334.
- Wang Z., and Gleichmann, H. (1998). GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocine in mice. *Diabetes*, **47**: 50-56.
- Wang, H., and Keiser, J.A. Vascular Endothelial Growth Factor upregulates the expression of Matrix Metalloproteinases in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res* **83**:832-840

- Weir G.C., Laybutt D.R., Kaneto H., Bonner-Weir S. and Sharma A. (2001) Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes*, **50** (Suppl. 1): S154-S159.
- Weir G.C. and Bonner-Weir S. (1990) Islets of Langerhans: The puzzle of intra-islet interactions and their relevance to diabetes. *J Clin Invest*, **85**: 983-987.
- Weir G.C. and Bonner-Weir S. (2004) Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes*, **53** (Suppl. 3): S16-S21.
- Wen L., Wong F.S., Tang J., Chen N.Y., Altieri M., David C., Flavell R. And Sherwin R. (2000) In vivo evidence for the contribution of human histocompatibility leukocyte antigen (*HLA*)-*DQ* molecules to the development of diabetes. *J.Exp.Med.*, **191**: 97-104.
- White M.F. (2002) IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **283**: E413-422.
- Wickers L.S., Todd J.A., Peterson L.B. (1995) Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu.Rev.Immunol.*, **13**: 179-200.
- Wilkin T.J. (2001) The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between type 1 and type 2 diabetes. *Diabetologia*, **44**: 914-922.
- Wilson M.E., Scheel D., German M.S. (2003) Gene expression cascades in pancreatic development. *Mechanisms of Development*, **120**: 65-80.
- Winer, S., tsui, H., Lau, A., et al. (2003). Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. *Nat Med* **2**:198-205.
- Withers D.J., et al. (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, **391**: 900-904.
- Withers D.J., et al. (1999) IRS-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet*, **23**: 32-40.
- Wogensen L., Huang X. and Sarvetnick N. (1993) Leukocyte extravasation into the pancreatic tissue in transgenic mice expressing interleukin 10 in the islets of Langerhans. *J.Exp.Med.*, **178**: 175-185.
- Wu K.L., Gannon M., Peshavaria M., Offield M.F., Henderson E., Ray M., Marks A., Gamer L.W., Wright C.V., Stein R. (1997) Hepatocyte nuclear factor 3beta is involved in pancreatic beta-cell specific transcription of the *pdx-1* gene. *Mol.Cell Biol.*, **17**: 6002-6013.
- Wynn, T.C. (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* **214**:199-210.
- Xu, X., D'Hoker J, Stangé, G., et al. (2008). Beta cells can be generated from progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell.* **132**:197-207.
- Xuan S., et al. (2002) Defective insulin secretion in pancreatic beta cells lacking type 1 IGF receptor. *J.Clin.Invest.*, **110**: 1011-1019.
- Yamada, M., Kim, S., Egashira, K., Takeya, M., Ikeda, T., Mimura, O., Iwao, H. (2003). Molecular mechanism and role of endothelial Monocyte Chemoattractant Protein-1 induction by Vascular Endothelial Growth Factor. *Artheroscler Thromb Vasc Biol* **23**:1996-2001.
- Yang, Y., and Santamaria, P. (2006). Lessons on autoimmune diabetes from animal model. *clin Science.* **110**:627-639.
- Yoon J.W., Jun H.S. (2001) Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **928**: 200-211.
- Yoshitomi, H., and Zaret, K.S. (2004). Endothelial cell interactions initiate dorsal pancreas development by selectively inducing the transcription factor Ptf1a. *Development* **131**:807-817.
- Yurchenco, P.D., and Schinty, J.C., (1990). Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J* **4**:1577-1590.
- Zekzer D. et al. (1998) GAD-reactive CD4+ Th1 cells induce diabetes in NOD/SCID mice. *J.Clin.Invest.*, **101**: 68-73.
- Zhang, N., Richter, A., Suriawinata, J., Harbaran, S., Altomonte, J., Cong, L., Zhang, H., Song, K., Meseck, M., Bromberg, J., and Dong, H. (2004) Elevated vascular endothelial growth factor production in islets improves islet graft vascularization. *Diabetes* **53**(4):963-970.
- Zhang, X., Gaspard, J.P., Mizukami, Y., Li, J., Graeme-Cook, F., and Chung, D.C. (2005). Overexpression of cyclin D1 in pancreatic beta-cells in vivo results in islet hyperplasia without hypoglycemia. *Diabetes*. **54**:712-719.
- Zhou, Y.P., Madjidi, A., Wilson, M.E., Nothhelfer, D.A., Johnson, J.H, et al.(2005). Matrix metalloproteinase contribute to insulin insufficiency in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes*. **54**:2612-2619.
- Zimmet P., Alberti K.G. and Shaw J. (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, **414**: 782-787.
- Zittermann, S.I., and Issekutz, A.C. (2006) Endothelial growth factors VEGF and bFGF differentially enhance monocyte and neutrophil recruitment to inflammation *J Leuk Biol* **80**:247-57.