

FACULTAT DE VETERINÀRIA  
UNIVERSITAT AUTONÒMA DE BARCELONA

**ESTUDIO DE LA REGENERACIÓN DEL PÁNCREAS  
ENDOCRINO EN ANIMALES TRANSGÉNICOS:  
UNA NUEVA APROXIMACIÓN DE TERAPIA GÉNICA  
PARA DIABETES TIPO 1.**

MÓNICA GEORGE PALOP

Memoria presentada por la Ingeniera MÓNICA  
GEORGE PALOP para optar al grado de Doctora en  
Bioquímica.

Esta Tesis Doctoral se ha realizado bajo la dirección de  
la Dra. Fàtima Bosch i Tubert, en el Departamento de  
Bioquímica y Biología Molecular de la Facultat de  
Veterinària.

**FÀTIMA BOSCH i TUBERT**

**MÓNICA GEORGE PALOP**

Bellaterra, Noviembre 2000

*A mis padres, que sin estar a mi lado,  
nunca estuvieron ausentes y que desde la  
distancia me infundían la fuerza para seguir  
adelante.*

*A “Joseph”, mi apoyo incondicional, mi  
inspiración...*

## AGRADECIMIENTOS

*Siendo esta es la parte más leída, comentada e interpretada de todas las tesis, intentaré ser breve y parca, puesto que cada uno de los que leen estas líneas saben muy bien que el verdadero agradecimiento no se puede expresar con 4 palabras...*

*En primer lugar quiero agradecer a Fátima, a quien respeto por su labor como investigadora, admiro por su enorme capacidad de trabajo, y aprecio por su integridad como persona y su calidad humana...*

*Quiero agradecer de una forma muy especial a Edu, quien se supo ganar mi cariño y mi entera confianza y sin cuya inmensa ayuda hubiese sido imposible la culminación de este trabajo...Edu, gracias por tu amistad y tu alto sentido de la lealtad. Te voy a extrañar mucho...grazzie mille per éssere come sei...*

*También quiero agradecer a Alba, por su importante colaboración, y a “Martica”, por su dedicación, por su excelente trabajo y por su amistad...*

*Quiero darle un millón de gracias a mi tan querido y recordado “Alexín”, per la seva contagiosa alegría, per la seva inagotable energía, per tants moments bons y millors que hem compartit junts...*

*Quiero darle las gracias de todo corazón a Tura, por lo mucho que significó para mi su amistad...También quiero agradecer a Malika, por haber sabido ser una amiga sincera, por ser persona de férreas convicciones, difícil de manipular...*

*Muchas gracias a Mire, por haber estado siempre presente con una sonrisa en los labios, por su explosiva alegría, pero sobretudo por su sensibilidad, y los incontables detalles que nunca me pasaron desapercibidos...eres muy especial.*

*Gracias a Jean Cristophe por los iniciarme en los estudios con islotes.*

*Gracias a Ana Vilalta, por su pronta disposición para el trabajo y su siempre amable colaboración. Mil gracias a Carles por ser un genio en “sacar la pata del barro” cada vez que lo requerí con desesperada urgencia!. Y gracias por supuesto a Mercé, quien siempre estuvo a la disposición para ayudar, en lo que fuera.*

*No tengo palabras para agradecer a Pili, sin cuyo apoyo moral, el más valioso de los apoyos, y su amistad, el más valioso de los tesoros, hubiesen sido más dolorosas las caídas y menos dichosos los éxitos...Gracias también a “Carlitos”, por sus consejos y tantos gratos recuerdos que me llevo de él...*

*También, quiero darle unas gracias muy emotivas a Gabi, mi querida “compatriota”, quien tuvo siempre a mano la palabra oportuna y el don de saber escuchar... y por supuesto a “Gusta” por su inalterable sentido del buen humor...*

*Y en fin, gracias a todos aquellos que en una u otra oportunidad siempre estuvieron presentes, e hicieron de mi paso por este grupo toda una experiencia... Ana A., Ana P., Sylvie, María, Pedro, Gemma y Efrén. También quiero dar las gracias y desear suerte a las últimas "adquisiciones" Miguel, Sergio, Miquel, Antonio, Joel y Josep.*

*Agradezco a Roser Casamitjana y Antonio Armario por su ayuda en las determinaciones hormonales..*

*Agradecer asimismo al Fondo de Investigación sanitaria (95/1758 y 98/1063), Direcció General de Recerca (1997SGR00110 y 1999SGR00101) de la Generalitat de Catalunya, la Fundació Ramón Areces y la Fundació de La Marató de TV3 por su soporte financiero a estas investigaciones.*

*A todos ustedes quisiera dedicar unas reflexiones de uno de los escritores más brillantes que han existido. Se trata de una carta de despedida... Espero que les guste.*

*"Si por un instante Dios se olvidara de que soy una marioneta de trapo y me regalara un trozo de vida, posiblemente no diría todo lo que pienso, pero en definitiva pensaría todo lo que digo. Daría valor a las cosas, no por lo que valen, sino por lo que significan. Dormiría poco, soñaría más, entiendo que por cada minuto que cerramos los ojos, perdemos sesenta segundos de luz. Andaría cuando los demás se detienen, despertaría cuando los demás duermen. Escucharía cuando los demás hablan, y cómo disfrutaría de un buen helado de chocolate. Si Dios me obsequiara un trozo de vida, vestiría sencillo, me tiraría de bruces al sol, dejando descubierto, no solamente mi cuerpo sino mi alma. Dios mío, si yo tuviera un corazón, escribiría mi odio sobre el hielo, y esperaría a que saliera el sol. Pintaría con un sueño de Van Gogh sobre las estrellas un poema de Benedetti, y una canción de Serrat sería la serenata que les ofrecería a la luna. Regaría con mis lágrimas las rosas, para sentir el dolor de sus espinas, y el encarnado beso de sus pétalos... Dios mío, si yo tuviera un trozo de vida... No dejaría pasar un solo día sin decirle a la gente que quiero, que la quiero. Convencería a cada mujer u hombre de que son mis favoritos y viviría enamorado del amor. A los hombres les probaría cuán equivocados están al pensar que dejan de enamorarse cuando envejecen, sin saber que envejecen cuando dejan de enamorarse. A un niño le daría alas, pero le dejaría que él solo aprendiese a volar. A los viejos les enseñaría que la muerte no llega con la vejez sino con el olvido. Tantas cosas he aprendido de ustedes, los hombres... He aprendido que todo el mundo quiere vivir en la cima de la montaña, sin saber que la verdadera felicidad está en la forma de subir la escarpada. He aprendido que cuando un recién nacido aprieta con su pequeño puño, por vez primera, el dedo de su padre, lo tiene atrapado por siempre. He aprendido que un hombre sólo tiene derecho a mirar a otro hacia abajo, cuando ha de ayudarlo a levantarse. Son tantas cosas las que he podido aprender de ustedes, pero realmente de mucho no habrán de servir, porque cuando me guarden dentro de esa maleta, infelizmente me estaré muriendo."*

*Gabriel García Márquez*

## ABREVIATURAS

ABC	complejo abidina-biotina
ADP	adenosina-5'-difosfato
cAMP	adenosina-3',5'-monofosfato
ATP	adenosina-5'-trifosfato
APC	célula presentadora de antígeno
pb	pares de bases
BB	ratas Biobreeding Worcester
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	albúmina sérica bovina
cDNA	DNA copia
C1	elemento de repuesta a la glucosa
Con	control
cpm	cuentas por minuto
CRE	elemento de respuesta al cAMP
dl	decilitros
dATP	desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	desoxicitidina-5'-trifosfato
dGTP	desoxiguanosina-5'-trifosfato
GH	hormona de crecimiento
DAB	3'3'-diaminobenzidina
DCCT	<i>diabetes control and complications trial</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	etilendiaminotetraacetato
fmol	femtomol
g	gramos
GAD	ácido glutámico decarboxilasa
GIP	péptido inhibitorio gástrico
GLP-1	glucagón-like peptide
G-6-Pasa	Glucosa-6-fosfatas
x g	gravedades
GK	glucoquinasa
GLUT2	transportador de glucosa 2
GPO	glicerol fosfato oxidasa
HLA	antígenos leucocitarios humanos
HGF	factor de crecimiento de los hepatocitos
IAPP	<i>islet amyloid polipeptide</i>
IDDM	diabetes mellitus dependiente de insulina
ICA	<i>islet-cell autoantibodies</i>

ICE	enzima convertidora de interleuquinas
I- $\kappa$ B	proteína inhibidora del factor de transcripción nuclear kappa B
IFN- $\gamma$	interferon gama
IGF-I	factor de crecimiento similar a la insulina I
IGF-II	factor de crecimiento similar a la insulina II
IGFBP	proteínas de unión a los factores de crecimiento similares a la insulina
IL-1	interleuquina 1
IL-10	interleuquina 10
IL-4	interleuquina 4
IL-2	interleuquina 2
IRAP	proteína antagonista del receptor para la interleuquina 1 $\beta$
IRS-1	sustrato del receptor de la insulina 1
IRS-2	sustrato del receptor de la insulina 2
IUF1	<i>insulin upstream factor 1</i>
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltons
LPS	lipopolisacárido
mg	miligramos
min	minuto/s
ml	mililitro
mM	milimolar
MAPK	activador mitogénico proteína quinasa
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
MLD	<i>multiple low dosis</i>
mRNA	RNA mensajero
NEFA	ácido graso no esterificado
NK	células asesinas ( <i>natural killer</i> )
NF- $\kappa$ B	factor de transcripción nuclear Kappa B
NOD	<i>non obese diabetic</i>
iNOS	óxido nítrico sintasa
NO	óxido nítrico
NPY	neuropéptido Y
<sup>32</sup> P	fósforo 32
PAP	p-clorofenol/4-aminofenazona
PBS	tampón fosfato-salino
PC1	proteína convertasa 1
PC3	proteína convertasa 3
PCR	reacción en cadena de la polimerasa

PDGF	factor de crecimiento derivador de plaquetas
PDX-1	<i>pancreatic duodenal homeobox gene</i>
PGE <sub>2</sub>	prostaglandina E <sub>2</sub>
PI-3K	fosfatidilinositol 3 quinasa
PKC	proteína quinasa C
PKB	proteína quinasa B
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PL	lactógeno placentario
PRL	prolactina
PP	polipeptido pancreático
RIA	radioinmunoensayo
RIP	promotor del gen de la insulina de rata
RNA	ácido ribonucleico
RNasa	ribonucleasa
SAPK2/p38	proteína quinasa 2 activada por estrés
SDS	dodecilsulfato de sodio
SEM	error estándar de la media
ssDNA	DNA de esperma de salmón
Stz	estreptozotocina
TAE	tampón tris-acetato-EDTA
TE	tampón tris-EDTA
Tg	transgénico/a
TG	triglicéridos
TNF $\alpha$	factor necrótico tumoral $\alpha$
TNF $\beta$	factor necrótico tumoral $\beta$
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP nick labeling</i>
U	unidades internacionales de actividad enzimática
VIP	péptido intestinal vasoactivo
VNTR	número variable de repeticiones en tandem
vol	volumen



---

**ÍNDICE**

<b>I. PRESENTACIÓN</b>	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	
1. CONTROL DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA	3
2. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL PÁNCREAS ENDOCRINO	4
3. LA INSULINA	6
3.1. BIOSÍNTESIS DE INSULINA	6
3.2. REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE INSULINA	7
3.3. SECRECIÓN DE INSULINA	10
4. LA DIABETES MELLITUS TIPO 1	11
4.1. CLÍNICA DE LA DIABETES TIPO 1	12
4.2. FACTORES GENÉTICOS EN LA PATOGÉNESIS DE LA DIABETES TIPO 1	12
4.3. EVENTOS INMUNOLÓGICOS DE LA DIABETES TIPO 1	14
5. TERAPIA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1	16
5.1. TERAPIA SUSTITUTORIA CON INSULINA	16
5.1.1. INYECCIONES SUBCUTÁNEAS DE INSULINA	16
5.1.2. BOMBAS DE INSULINA	16
5.2. TRANSPLANTES	17
5.3. TERAPIA GÉNICA	17
5.3.1. TERAPIA CELULAR	18
5.3.2. INCREMENTO DE LA CAPTACIÓN DE GLUCOSA	20
5.3.3. PREVENCIÓN DEL ATAQUE AUTOINMUNE	21
5.3.3.1. Inducción de tolerancia	22
5.3.3.2. Modificación de la presentación de antígenos	23
5.3.3.3. Apoptosis y supervivencia de las células $\beta$	23
5.3.4. REGENERACIÓN DE ISLOTES	25
5.3.4.1. Neogénesis de la célula $\beta$	26
5.3.4.2. Replicación de células $\beta$	27
6. EL FACTOR DE CRECIMIENTO SEMEJANTE A LA INSULINA I	30
6.1. ESTRUCTURA Y SÍNTESIS	30
6.2. PAPEL FISIOLÓGICO Y MECANISMO DE ACCIÓN	30
<b>III. OBJETIVOS</b>	34

---

<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	35
1. RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN IGF-1 EN CÉLULAS $\beta$	35
2. EVALUACIÓN DE LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS TRAS INDUCCIÓN DE DIABETES EXPERIMENTAL	37
2.1. ANÁLISIS DE LAS GLUCEMIAS DE LOS ANIMALES TRATADOS CON STZ	38
2.2. TASA DE SUPERVIVENCIA EN ANIMALES TRATADOS CON STZ	38
2.3. ANÁLISIS DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE IGF-1 E INSULINA	40
2.4. CAMBIOS EN EL PESO CORPORAL DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS SOMETIDOS AL TRATAMIENTO CON STZ	40
2.5. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DEL PÁNCREAS DE LOS ANIMALES TRATADOS CON STZ	42
2.6. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL PÁNCREAS DE LOS ANIMALES TRATADOS CON STZ	44
3. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE ANIMALES TRANSGÉNICOS CONGÉNICOS CON LA CEPA CD-1	47
3.1. ANÁLISIS DE LA GLUCEMIA EN ESTADO DE ALIMENTACIÓN Y AYUNO DE LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS N4 CD-1 TRATADOS CON STZ	48
3.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES SÉRICAS DE INSULINA EN ANIMALES TRANSGÉNICOS DE LA CEPA CD-1 TRATADOS CON STZ	49
3.3. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE AGUA Y COMIDA EN ANIMALES TRANSGÉNICOS DE LA CEPA CD-1 TRATADOS CON STZ	51
3.4. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS SÉRICOS DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS N4 TRAS EL TRATAMIENTO CON STZ	53
3.5. TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA	54
3.6. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DEL PÁNCREAS A LAS 2 SEMANAS TRAS EL TRATAMIENTO CON STZ	55

---

3.7. DETERMINACIÓN DE LA TASA DE APOPTOSIS	58
3.8. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DEL PÁNCREAS A LOS 4 MESES TRAS EL TRATAMIENTO CON STZ	60
3.9. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DEL PÁNCREAS DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS TRATADOS CON STZ	61
3.10. DETERMINACIÓN DE LA TASA DE REPLICACIÓN DE LAS CÉLULAS $\beta$ EN ANIMALES TRANSGÉNICOS TRAS EL TRATAMIENTO CON STZ	62
<b>V. CONCLUSIONES</b>	68
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	69
1. MATERIALES	69
1.1. ANIMALES	69
1.2. REACTIVOS	69
1.3. SONDAS	69
1.4. ANTICUERPOS	69
2. MÉTODOS	70
2.1. OBTENCIÓN Y ANALISIS DE DNA	70
2.1.1. OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO	70
2.1.2. ANÁLISIS DE LOS ANIMALES POR PCR	70
2.2. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA	71
2.2.1. PREPARACIÓN DE RNA TOTAL	71
2.2.2. ELECTROFORESIS DEL RNA EN GELES DESNATURALIZANTES DE AGAROSA/FORMALDEHIDO	71
2.2.3. ANÁLISIS DE RNA POR NORTHERN BLOT (HIBRIDACIÓN DNA-RNA)	72
2.2.4. MARCAJE RADIOACTIVO DE SONDAS	73
2.3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS SÉRICOS	73
2.3.1. GLUCOSA	74
2.3.2. INSULINA	74
2.3.3. IGF-1	74
2.3.4. TRIGLICÉRIDOS	74
2.3.5. ACIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS (NEFAS)	74
2.3.6. $\beta$ -HIDROXIBUTIRATO	75
2.4. TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA	75

2.5. INDUCCIÓN DE DIABETES EXPERIMENTAL MEDIANTE STZ	75
2.6. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO	75
2.6.1. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE REPLICACIÓN DE LA CÉLULA $\beta$	76
2.6.2. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO	76
2.6.3. DETECCIÓN DE APOPTOSIS EN LA CÉLULA $\beta$	77
2.6.4. ANÁLISIS DEL GRADO DE INSULITIS	77
2.7. CÁLCULO ESTADÍSTICO	78
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	79

## **I. PRESENTACIÓN**

La diabetes mellitus es la enfermedad metabólica más común, ya que afecta de un 2 a un 7% de la población mundial. De un 5 a un 10% de los pacientes se les puede agrupar en la categoría de diabetes mellitus dependiente de insulina o diabetes tipo 1, la cual se manifiesta generalmente antes de los 40 años, frecuentemente durante la adolescencia, y es el resultado de la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans en el páncreas. Los pacientes de diabetes tipo 1 se identifican después del inicio de la enfermedad, cuando la destrucción de las células  $\beta$  ya es casi completa. La regeneración de las células  $\beta$  a partir de células precursoras de los islotes podría curar la enfermedad. Sin embargo, para ello se requiere identificar factores que induzcan la replicación y neogénesis de células  $\beta$ , y que eviten la destrucción autoinmune de los nuevos islotes recién formados. Las células de los islotes son reemplazadas constantemente mediante un recambio lento probablemente a partir de unas pocas células que mantienen la capacidad replicativa. Además, las estructuras de los ductos en el páncreas adulto contiene células pluripotenciales (stem) que pueden diferenciar a células endocrinas y generar nuevos islotes. Se han descrito varios factores de crecimiento que inducen la replicación de islotes fetales y neonatales *in vitro*, o bien, que son mitogénicos para las células epiteliales de los ductos.

El IGF-I es un polipéptido que presenta una alta homología de secuencia con la insulina. El IGF-I ejerce efectos metabólicos similares a los de la hormona y, además, estimula la proliferación y la diferenciación celular. Su principal papel es estimular la proliferación y diferenciación celular. El IGF-I circulante es mayoritariamente producido por el hígado, si bien se ha observado que en ratón adulto el páncreas expresa niveles elevados de IGF-I, donde actúa de manera paracrina/autocrina. Además, la expresión de IGF-I aumenta en las áreas de regeneración tras pancreatectomía parcial, lo cual sugiere que IGF-I puede tener un importante papel en el crecimiento y diferenciación del tejido pancreático. Además, el IGF-I incrementa la proliferación de células  $\beta$  *in vitro*. Por otra parte, también se ha descrito que el IGF-I protege a los islotes frente a la inhibición mediada por citoquinas de la secreción de insulina, de la inducción de la formación de óxido nítrico y de la muerte celular por apoptosis.

En este trabajo hemos utilizado animales transgénicos que sobreexpresan IGF-I en células  $\beta$  pancreáticas, bajo el control del promotor del gen de la insulina (rat insulin-

1 promoter (RIP-1), a fin de estudiar si la producción de IGF-I por las células  $\beta$  es capaz de regenerar el páncreas endocrino tras inducción de diabetes experimental. En estos ratones transgénicos hemos observado que la expresión de IGF-I en células  $\beta$  contrarrestaba la citotoxicidad y la insulinitis tras tratamiento con estreptozotocina (STZ). Los ratones controles tratados con STZ desarrollaban una elevada hiperglucemia, hipoinsulinemia, pérdida de peso y morían. Por contra, los ratones transgénicos tratados con STZ desarrollaban hiperglucemia, hipoinsulinemia, polidipsia y polifagia pero gradualmente normalizaban todos estos parámetros y sobrevivían. Esta recuperación de los parámetros metabólicos en los animales transgénicos tratados con STZ era paralela a un incremento en la masa de células  $\beta$ , a través de un incremento en la neogénesis y replicación de células  $\beta$ .

Por tanto, estos resultados indican que la producción local de IGF-I en células  $\beta$  es capaz de inducir regeneración del páncreas endocrino y contrarrestar la diabetes experimental. Además, sugieren que la transferencia del gen de IGF-I a páncreas podría constituir una terapia más adecuada para esta enfermedad.

## **II. INTRODUCCIÓN**



## **1. CONTROL DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA.**

De entre las diferentes fuentes de energía que utiliza la célula, la glucosa es la principal. En los mamíferos, la regulación de la concentración del azúcar en sangre es esencial para el organismo, ya que estados de hiperglucemia o hipoglucemia extremos pueden ser críticos para la supervivencia. En el hombre y en los mamíferos en general, la regulación de la concentración de glucosa se realiza mediante un equilibrio entre el flujo de glucosa dentro y fuera del espacio extracelular a través de la secreción coordinada de insulina y el glucagón (DeFronzo, 1997; Unger, 1991).

Después de la ingestión de alimentos, el mantenimiento de la homeostasia de la glucosa depende de tres procesos que ocurren simultáneamente de una manera coordinada. (a) En respuesta al incremento de la glucosa plasmática, se estimula la producción y secreción de insulina por parte de las células  $\beta$  del páncreas. (b) El incremento en la glucemia y en la insulinemia induce la captación de glucosa por los tejidos periféricos (hígado, músculo y tejido adiposo). (c) Se inhibe la secreción de glucagón, lo que suprime la producción hepática de glucosa. Durante el ayuno, la captación de glucosa ocurre en tejidos insulino independientes, especialmente en cerebro. La normoglucemia se mantiene gracias a la acción del glucagón y de otros factores hormonales y nerviosos, a través de un incremento en la producción de glucosa por parte del hígado (mediante la estimulación de la gluconeogénesis y de la glucogenólisis). Alteraciones funcionales a nivel de célula  $\beta$ , hígado, músculo o tejido adiposo, pueden conducir a trastornos en la homeostasis de la glucosa, al desarrollo de intolerancia a la glucosa o, incluso, a diabetes mellitus (DeFronzo, 1997).

Para poder ser utilizada, la glucosa ha de ser transportada al interior de las células y, posteriormente, debe ser fosforilada a glucosa-6-fosfato (glucosa-6-P). El transporte lo realizan un sistema de proteínas transportadoras de glucosa (GLUTs), situadas en la membrana plasmática. A continuación, un grupo de proteínas citoplasmáticas, denominadas hexoquinasas se encargan de la fosforilación. La glucosa-6-P resultante podrá intervenir en las diferentes vías metabólicas, como la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato o ser almacenada en forma de glucógeno.

## **2. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL PÁNCREAS ENDOCRINO.**

Los islotes pancreáticos fueron descubiertos en 1869, por Paul Langerhans. La función endocrina del páncreas no fue esclarecida sino hasta 20 años más tarde por Von Mering y Minkowski; y fue posteriormente en 1894 cuando Laguesse atribuyó esta función a los islotes, a los cuales denominó islotes de Langerhans.

La importancia de los islotes radica en que representan el centro de control de la homeostasia de la glucosa en el organismo. Para conseguirlo, deben estar ricamente vascularizados e inervados, de manera tal que puedan responder a los estímulos metabólicos, endocrinos o nerviosos que constantemente se producen en el organismo.

Un páncreas humano adulto normal contiene cerca de 1 millón de islotes, los cuales constituyen el 2-3% del total de la masa de la glándula. Los islotes varían considerablemente de tamaño, desde unas pocas docenas de células hasta miles de ellas. A pesar de estas variaciones la arquitectura interna de los islotes es característica. Los islotes de Langerhans están formados por cuatro tipos celulares distintos: células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y células PP, productoras respectivamente de glucagón, insulina, somatostatina y polipéptido pancreático. Las células  $\alpha$  ocupan la periferia, las  $\beta$ , mayoritarias, la parte central del islote, y entre las dos se encuentran algunas células  $\delta$  y PP. La proporción de células  $\beta$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  y PP en un islote adulto es de 68:20:10:2 respectivamente. Las hormonas que se producen en el islote pancreático son liberadas directamente a los capilares sanguíneos y a través de la vena porta son transportadas hasta el hígado y al resto del organismo (Esquema I).

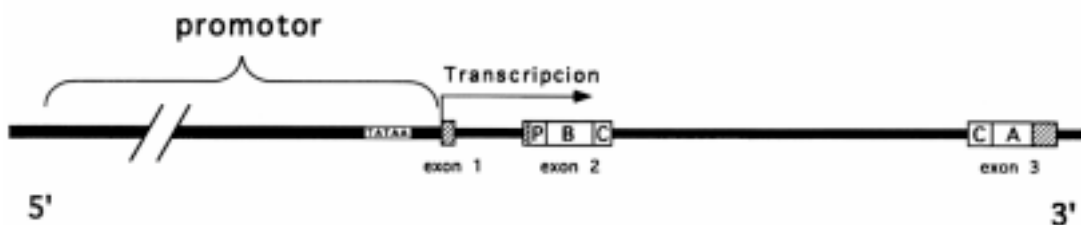
**Esquema I. Distribución de los 4 tipos celulares en el islote de Langerhans.** El islote pancreático está formado por células  $\alpha$ , que ocupan la periferia del islote, células  $\beta$ , situadas en la parte central, y células  $\delta$  y PP, distribuidas en la zona intermedia.

### 3. LA INSULINA.

Una vez la insulina es sintetizada y secretada al torrente circulatorio, se distribuye a los diferentes tejidos diana. Allí, esta hormona actúa a través de un receptor de membrana específico que pertenece a una familia de receptores que tienen actividad tirosina quinasa (Pickup y Williams, 1997). Entre los efectos de la insulina se encuentran los siguientes: i) un incremento de la captación y utilización de la glucosa; ii) una inhibición de la producción hepática de glucosa; iii) un efecto antilipolítico y, por último, iv) la estimulación de la síntesis de DNA y de proteínas.

#### 3.1. Biosíntesis de insulina.

La estructura de la insulina y su gen han sido altamente conservadas durante la evolución, reflejando su determinante importancia en la regulación del metabolismo. La síntesis de insulina es un proceso complejo que implica la formación de dos moléculas precursoras, la preproinsulina y la proinsulina. En humanos, el gen que codifica para la preproinsulina, el precursor primario de la insulina, está localizado en el brazo corto del cromosoma 11. Posee tres exones: el primero codifica el péptido señal y el extremo N-terminal de la preproinsulina, el segundo la cadena B y parte del péptido C, y el tercero el resto del péptido C y la cadena A (Esquema II).



**Esquema II. Representación del gen de la insulina humana.**

La insulina, como otras proteínas exportables, se sintetiza por ribosomas asociados al retículo endoplasmático rugoso. Los 25 primeros aminoácidos de la preproinsulina constituyen el péptido señal que permite la entrada de la proteína dentro del retículo endoplasmático, asegurando la descarga de la preproinsulina al espacio cisternal. Posteriormente, se produce una separación proteolítica del péptido señal, con lo que la preproinsulina se convierte en proinsulina, que rápidamente se pliega y se forman los puentes disulfuro. La proinsulina está formada por una única cadena polipeptídica de 86 aminoácidos. Contiene las cadenas A y B de la insulina con la misma conformación que la insulina, pero se encuentran unidas por un péptido de conexión de 35 aminoácidos, llamado péptido C, que une el extremo carboxiterminal de

la cadena B con el extremo aminoterminal de la cadena A. La proinsulina tiene sólo un 5% de la actividad biológica de la insulina (Pickup y Williams, 1997).

Una vez plegada, la proinsulina se transporta al aparato de Golgi donde es empaquetada en vesículas. La conversión de proinsulina a insulina implica la acción secuencial de proteasas específicas, la PC1 (también conocida como PC3) y la PC2, que se encuentran presentes en los gránulos de almacenaje. Estas endopeptidasas rompen la molécula por lugares específicos: la PC1 es responsable de la rotura entre Arg31 y Arg32 (Baillyes y col., 1992; Neerman-Arbez y col., 1993) y la PC2 entre Lys64 y Arg65 (Bennett y col., 1992), provocando la separación del péptido de conexión. Al liberarse del péptido C, la insulina, dado que se convierte en una molécula menos soluble, forma cristales en presencia de  $Zn^{2+}$ , lo que permite el almacenamiento de la hormona de forma más concentrada (Landstrom y col., 1988). El mecanismo de la biosíntesis se muestra en el Esquema III.

### **3.2. Regulación de la biosíntesis de insulina.**

La secreción de insulina por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans es fundamental en la regulación de la homeostasia energética y en el control de la glucemia. Un aumento en la secreción de insulina evita la hiperglucemia, mientras que el glucagón y la adrenalina se liberan en caso de hipoglucemia. Las alteraciones funcionales de las células  $\beta$  pancreáticas desencadenan graves problemas metabólicos como la diabetes mellitus.

La biosíntesis de la insulina en la célula  $\beta$  está regulada, principalmente, por la concentración extracelular de glucosa, que actúa básicamente a través de tres mecanismos: 1) un incremento selectivo de la transcripción del gen de la insulina; 2) una estabilización de los mRNA de insulina preformados; 3) una rápida y selectiva estimulación de la traducción de los mRNA de insulina.

Se conocen muchos factores reguladores de la biosíntesis y secreción de insulina. Entre ellos se encuentran los nutrientes como la glucosa, aminoácidos, cuerpos cetónicos y ácidos grasos; algunos mediadores del sistema nervioso como la noradrenalina, galanina, acetilcolina, péptido intestinal vasoactivo (VIP),

neuropéptido Y; los eucosanoides (PGE<sub>2</sub>); señales hormonales como el glucagón, péptido inhibitorio gástrico (GIP), GLP-1 (glucagón-like peptide), colecistoquinina;

**Esquema III. Mecanismos que regulan la biosíntesis de insulina.**

y finalmente algunos agentes farmacológicos (sulfonilureas). Sin embargo, cabe destacar que la glucosa es el principal factor regulador tanto de la síntesis como de la secreción de la insulina. (Pickup y Williams, 1997).

Se ha descrito que el factor de transcripción *pancreatic duodenal homeobox 1* (PDX-1) media la señal de la glucosa en la transcripción del gen de la insulina a través de la vía activada por el fosfatidilinositol 3-quinasa (PI-3K) y la protein quinasa 2 activada por estrés (SAPK2/p38) (Macfarlane WM y col, 1997). La estimulación de esta vía conlleva a la fosforilación y activación de la forma citosólica de PDX-1 y su translocación al núcleo (Macfarlane y col, 1999). Además, se ha demostrado que esta regulación es independiente de los niveles de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular (Macfarlane WM y col, 2000).

Además del de la insulina, PDX-1 se une a promotores de otros genes que se expresan preferentemente en la célula  $\beta$ ; polipéptido amiloide del islote (IAPP) (Bretherton-Watt D y col, 1996), transportador de glucosa GLUT-2 (Waeber G y col, 1996) y glucoquinasa (Watada H y col, 1996), siendo estos dos últimos genes claves en la regulación de la secreción de insulina. Se desconoce el mecanismo de PDX-1 en la regulación de estos genes.

El promotor del gen de la insulina se expresa principalmente en las células  $\beta$  pancreáticas, aunque se ha detectado su expresión también en otros tejidos. Los límites exactos del promotor no están definidos, se han encontrado secuencias que a una distancia de 4 kb del codón de inicio ejercen influencia sobre el funcionamiento del promotor.

En rata y ratón existen dos genes que codifican para la insulina, mientras que en humanos solo existe uno (Edlund y col, 1985). El promotor de los genes de rata I y II y el promotor del gen de la insulina humana son los promotores de la insulina mejor caracterizados. A pesar de que sus productos, la insulina, presenta una estructura altamente conservada entre especies, no ocurre lo mismo con las secuencias de sus regiones promotoras. Debido a que la identificación de sus secuencias reguladoras se realiza en forma paralela en distintos laboratorios, es frecuente observar que la misma región sea nombrada de distintas formas, dando lugar a mucha confusión cuando se intenta familiarizar con el tema. Con este motivo, se creó una nomenclatura simplificada (German M y col, 1995). En el Esquema IV se muestran las regiones reguladoras más relevantes del promotor.

La glucosa incrementa los niveles de mRNA de insulina (Docherty y Clark, 1994). A fin de determinar que elementos regulados por glucosa actuaban en el promotor de la insulina, se realizaron experimentos de mutagénesis dirigida en regiones hasta 350 pb antes del codón de inicio, sin ningún éxito. Se estableció entonces que en la regulación de la expresión del gen por glucosa intervienen varios factores que actúan sinérgicamente. Entre ellos se encuentran, el factor de transcripción homeodominio PDX-1 (Petersen HV, 1994), el factor de transcripción IUF1 del tipo hélice-lazo-hélice (Macfarlane WM, 1994) que se une a E2, el factor aún sin caracterizar RIPE3b1 que se une al elemento C1 del promotor de la insulina de rata (Sharma A, 1995) y un factor que se une a un elemento de regulación negativa aún sin caracterizar (Sander M, 1998).

Diversos estudios en animales transgénicos han mostrado que fragmentos de los promotores de los dos genes de insulina de rata y del promotor humano son capaces de dirigir la expresión de genes exógenos de forma específica a las células  $\beta$  del páncreas (Hanahan, 1985; Selden y col., 1986a; Adams y col., 1987; Dandoy-Dron y col., 1991; Devedjian JC y col, 2000; Herrera PL y col, 2000). Estos estudios han demostrado que la estricta regulación que se conoce de la expresión del gen de la insulina endógena por glucosa, aminoácidos o agentes hipoglucemiantes como la tolbutamida se mantiene en el transgén.

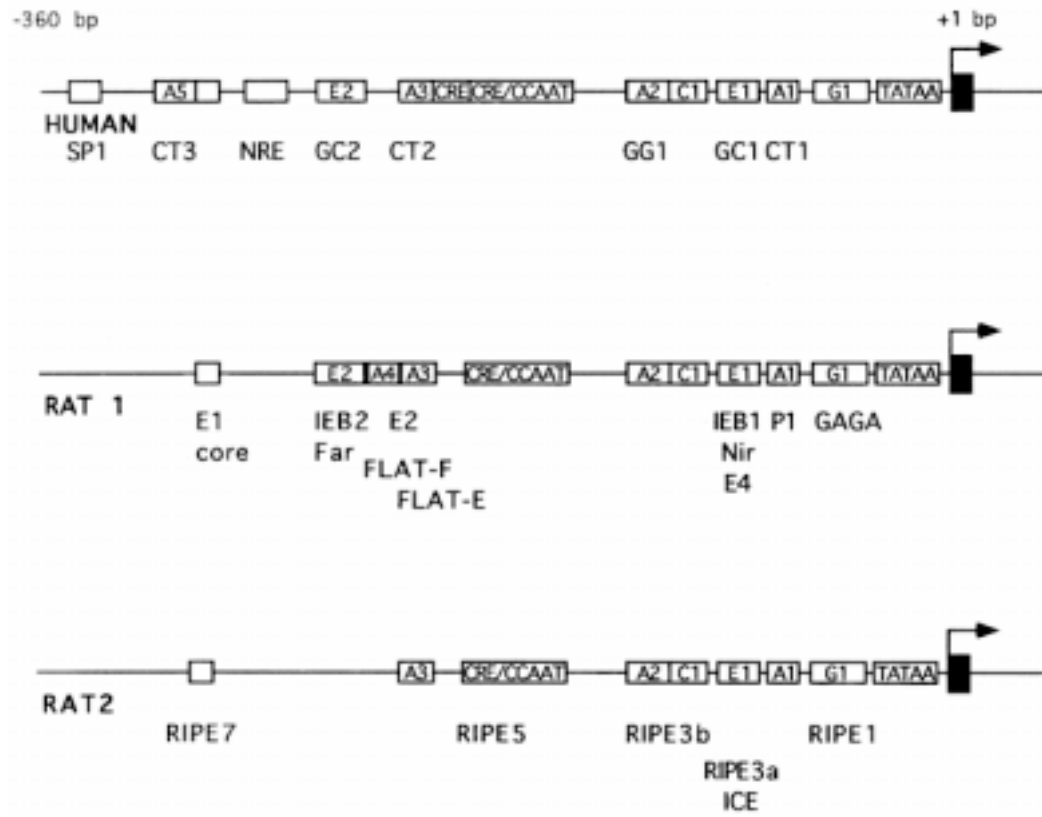
### **3.3. Secreción de insulina.**

Una vez sintetizada y almacenada en vesículas, la insulina se secreta en respuesta a distintos factores, siendo el más importante la glucosa. Así, la glucosa para estimular la secreción de insulina en las células  $\beta$  debe ser convertida en glucosa 6-fosfato y metabolizada a través de la glucólisis y el ciclo de Krebs. El incremento en los niveles de ATP intracelular llevan al cierre de canales de potasio dependientes de ATP (KATP). La consiguiente despolarización de membrana, abre los canales los canales de calcio dependientes de voltaje, esto conlleva la entrada y el incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Un incremento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicos resultan en la exocitosis de la insulina de los gránulos de secreción (Docherty K y col, 1994).

Así pues, los niveles de insulina sérica están controlados en cada momento por las variaciones de las concentraciones extracelulares de nutrientes, hormonas y neurotransmisores. La respuesta insulinosecretora de la célula  $\beta$  a todos los reguladores fisiológicos es rápida, produciéndose segundos después de la exposición a los estímulos. Por otra parte, cambios en la situación fisiológica del animal (modificaciones debidas a



factores ontogénicos, nutricionales o endocrinos) conducen a regulaciones adaptativas más lentas de la célula  $\beta$ .



**Esquema IV. Región promotora/reguladora del gen de la insulina humana, y de rata I y II.** Sitios de unión a factores de transcripción. Elementos involucrados en la transcripción del gen: Caja TATA, E1, E2. Elementos que confieren especificidad de tejido: E1, E2 y A3, A4. Elemento de respuesta a cAMP: CRE. Elemento de respuesta a glucosa: C1.

#### **4. LA DIABETES MELLITUS TIPO 1.**

La diabetes mellitus tipo 1 es el resultado de la destrucción autoinmune progresiva de las células  $\beta$  pancreáticas. Esto trae como consecuencia la hiperglucemia crónica que la caracteriza. Los pacientes de diabetes tipo 1 dependen de inyecciones subcutáneas diarias de insulina para su supervivencia. Esto refleja la severidad de la deficiencia de insulina, sin la cual, la lipólisis en tejido adiposo se activa incontroladamente, generando altos niveles de ácidos grasos libres los cuales son metabolizados a cuerpos cetónicos en el hígado. Así se produce la cetoacidosis diabética, que conlleva al coma y muerte del paciente.

##### **4.1. Clínica de la diabetes tipo 1.**

Los síntomas clásicos de la enfermedad son poliuria, generalmente acentuada durante la noche (nocturia), polidipsia, polifagia, fatiga generalizada y una dramática pérdida de peso. Otros síntomas menos frecuentes son: calambres, visión borrosa e infecciones de piel. La hiperglucemia crónica de la diabetes también está asociada con daños a largo plazo. Se ha postulado que la hiperglucemia es el principal factor responsable del desarrollo de las complicaciones secundarias de esta enfermedad (patología microvascular en retina y riñón y complicaciones neurológicas). Como consecuencia de esta patología microvascular, la diabetes mellitus es actualmente la causa principal de ceguera en adultos y la responsable de un tercio de los casos de fallo renal crónico. Se cree que la glucosilación de proteínas y el exceso de producción de compuestos de polioliol a partir de glucosa estarían involucrados entre los mecanismos responsables del daño ocasionado en los diferentes tejidos como consecuencia de una hiperglucemia crónica. Los pacientes con diabetes tienen mayor incidencia de enfermedades aterogénicas cardiovasculares, vasculares periféricas y cerebrovasculares.

##### **4.2. Factores genéticos en la patogénesis de la diabetes tipo 1.**

La diabetes tipo 1 frecuentemente se presenta de forma abrupta, con una marcada hiperglucemia, poliuria y cetoacidosis, que ocurren como resultado de la deficiencia de insulina. Esta presentación de la enfermedad sugería que el inicio de la diabetes tipo 1 era por una causa puntual. Sin embargo, ahora parece claro que el desarrollo de la enfermedad es un proceso crónico que se puede dividir en varias etapas. Existen individuos con una predisposición genética a desarrollar la enfermedad, en los cuales se inicia un proceso autoinmune posiblemente como respuesta a ciertos factores ambientales. Es un proceso de autoinmunidad caracterizado por la presencia de

autoanticuerpos y una destrucción progresiva de las células  $\beta$ , pero manteniendo la glucemia y el test de tolerancia a la glucosa normal en las primeras etapas. A medida que avanza la destrucción de las células  $\beta$  se altera el test de tolerancia y se instaura el proceso diabético.

La destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos e insulinitis. Los autoanticuerpos presentes en la diabetes tipo 1 actúan frente antígenos de la célula  $\beta$ , incluyendo la insulina, la ácido glutámico descarboxilasa (GAD65 y 67), proteínas de membrana que son homologas a las tirosina fosfatasas (ICA512 y IA-2), y al gangliosido neuroendocrino del islote (Maclaren y col, 1999). La insulinitis, en cambio, se caracteriza por infiltrados linfocitarios en los islotes, principalmente células CD8 y CD4, células B, macrófagos y células asesinas (NK). Las causas de la diabetes tipo 1 y el desencadenamiento del proceso autoinmune son complejas, incluye tanto la predisposición genética como factores ambientales. La herencia de dicha predisposición, no sigue un patrón de herencia Mendeliana simple. Parece ser que la penetrancia de los genes involucrados en esta enfermedad está influenciada por factores ambientales aún desconocidos. Además, estudios tanto en ratones como en humanos demuestran que la enfermedad es poligénica. Se han usado dos tipos de aproximaciones para identificar estos genes; identificación de genes candidatos, comparando la frecuencia de alelos entre poblaciones diabéticas y controles, y analizando el genoma en busca de *loci* cromosómicos asociados con la susceptibilidad a padecer la enfermedad. Como *locus* candidatos se encuentran el del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y el antígeno leucocitario humano (HLA), identificado como *locus* IDDM1 (Davies y col, 1994). El complejo mayor de histocompatibilidad contiene dos familias de genes; los genes de clase I, muy polimórficos y los genes de clase II. Los genes de clase I presentan los antígenos a los linfocitos T citotóxicos, y los de clase II presentan los antígenos a las células cooperadoras T (*T helper*). Hay dos clases de genes principales dentro de la familia de genes de clase II, los genes DR y los DQ (Buzzetti y col, 1998). Inicialmente se demostró la asociación de los alelos de clase I a la diabetes tipo 1, sin embargo ahora parece claro que las moléculas de clase II son más importantes como factores de riesgo a padecer la enfermedad.

Más tarde se identificó un segundo *locus* en el gen de la insulina, llamado IDDM2, localizado en el cromosoma 11 (Pugliese y col, 1997). El polimorfismo en esta región se debe al número variable de repeticiones en tandem (VNTR) en la región 5' flanqueante del gen de la insulina. Existen tres alelos caracterizados; el de clase I que incrementa de dos a cinco veces la predisposición a padecer la enfermedad, el de clase III que parece tener un efecto dominante protectorio y el de clase II, aún sin caracterizar

su relación con la enfermedad. Se ha demostrado que el número de repeticiones en tándem modula la expresión del gen de la insulina *in vitro*, y de alguna manera confiere susceptibilidad a padecer la enfermedad.

Ya que entre los *loci* IDDM1 y IDDM2 solo se puede explicar un 50 % de las asociaciones familiares a diabetes tipo 1, seguramente otros genes debían estar involucrados. Con esta finalidad meticolosos estudios del genoma han identificado diversos *loci* implicados en la susceptibilidad para la diabetes tipo 1, como son los IDDM3, IDDM4, IDDM5, IDDM7, IDDM8, IDDM11, IDDM12, IDDM13 (Lowe WL, 1998). Ninguno de ellos tiene un papel tan importante como el IDDM1 en el riesgo a padecer la enfermedad, sino que más bien confieren un riesgo similar al de IDDM2. Además, pueden existir diferentes tipos de interacciones (epistasis) entre estos *loci*, de manera que el genotipo de un *locus* afecta a la contribución de otro *locus*.

La identificación de los factores genéticos que predisponen a un individuo a padecer diabetes tipo 1 tiene importantes implicaciones clínicas. Actualmente, los individuos se diagnostican cuando la mayor parte de las células  $\beta$  ya han sido destruidas. Por ello, si bien no todos los individuos con predisposición genética desencadenan este proceso, un tratamiento prematuro i/o medidas profilácticas podrían amortiguar el impacto que tiene esta enfermedad (Pickup y Williams, 1997; Lowe WL, 1998).

### **4.3. Eventos inmunológicos de la diabetes tipo 1.**

Actualmente se conoce que la diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T. Prueba de ello es: i) la infiltración linfocitaria de los islotes, denominada insulitis (Gepts W, 1965); ii) la asociación de diabetes con otras enfermedades autoinmunes; iii) la presencia de anticuerpos contra células de islotes (ICA "islet-cell autoantibodies"), de autoanticuerpos y otros anticuerpos específicos en el suero de pacientes diabéticos con aparición reciente de la enfermedad (Lenmark A, 1978; Dobersen MJ y col, 1980); iv) la asociación de diabetes tipo 1 con los genes de respuesta inmune HLA (Signal DP, 1973; Nerup J y col, 1974; Sanjeevi CB y col, 1995); v) anomalías en las cantidades relativas de linfocitos CD4/CD8 circulantes (Peakman M, 1994) y vi) la remisión de la diabetes tipo 1 con drogas inmunosupresoras como ciclosporina (The Canadian-European Randomized Control Trial Group, 1988).

La diabetes tipo 1 está fuertemente asociada con ciertos tipos de HLA y con la presencia de ICAs. Los dos principales autoantígenos son GAD65 (ácido glutámico

decarboxilasa) e insulina. En cuanto a la respuesta autoinmune se conoce muy poco, habiéndose centrado los estudios en los autoanticuerpos circulantes más que en las respuestas de los linfocitos T. El anticuerpo para la proteína GAD65 muestra la mayor sensibilidad, especificidad y valor predictivo para la diabetes tipo 1, por lo que GAD65 puede ser un autoantígeno que inicia la lesión en la célula  $\beta$ .

La destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas es un proceso lento, que puede durar años antes de que se haya completado, lo cual permitiría intervenir oportunamente a fin de evitar su completa destrucción (Yoon JW y col, 1998; Mauricio D y col, 1998). Sin embargo, generalmente la enfermedad es detectada una vez la destrucción es prácticamente total. En la última década, se ha conseguido un considerable progreso en la comprensión de los procesos patogénicos de la enfermedad. Modelos animales tales como las ratas BB (*bio-breeding*) y los ratones NOD (*non obese diabetic*) han contribuido al entendimiento de los mecanismos patogénicos (Mauricio D y col, 1998). Se considera que la respuesta autoinmune contra las células  $\beta$  resulta de un desorden en la inmunoregulación (Rabinovitch y col, 19994; Rabinovitch y col, 1998). De acuerdo con este concepto, una subclase de células T, las Th 1 (*T-helper 1*), y sus citoquinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  dominan sobre la subclase inmunoreguladora Th 2 (supresora) y sus citoquinas IL-4 e IL-10. Esto permite que las citoquinas tipo 1 inicien la cascada de procesos inmunes/inflamatorios en el islote (insulinitis), culminando con la destrucción de la célula  $\beta$  (Rabinovitch y col, 19994; Rabinovitch y col, 1998). Las citoquinas producidas por los linfocitos Th 1 pueden activar las células T citotóxicas que interactúan específicamente con las células  $\beta$  y las destruyen. Pueden también interactuar con macrófagos que producen citoquinas proinflamatorias, como IL-1 y TNF- $\alpha$ , y radicales libres que son altamente tóxicos para las células  $\beta$  pancreáticas. Además, las citoquinas IL-1, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  son citotóxicas por sí mismas para la célula  $\beta$ , en gran parte debido a la inducción de la formación de radicales libres oxigenados, NO (óxido nítrico) y peroxinitritos (Rabinovitch y col, 1994; Rabinovitch y col, 1998).

## **5. TERAPIA DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1.**

### **5.1. Terapia sustitutoria con insulina.**

#### **5.1.1. Inyecciones subcutáneas de insulina.**

Actualmente, la mayoría de pacientes son tratados con inyecciones subcutáneas de preparaciones de insulina humana recombinante que intentan mimetizar los perfiles fisiológicos de la hormona (niveles basales bajos a los que se superponen picos postprandiales de secreción de insulina). La insulina administrada en solución es rápidamente absorbida, y es de acción rápida, mientras que suspensiones de partículas de insulina de diferentes tamaños proporcionan acción intermedia y larga. Sin embargo, la mezcla de insulina soluble con lenta reduce la disponibilidad de los componentes de acción rápida (Heine y col., 1985). Una de las principales deficiencias de las insulinas de acción retardada es la absorción variable a partir del tejido subcutáneo (Binder y col., 1984). Además, las preparaciones de acción retardada no son generalmente capaces de producir niveles basales de insulina adecuados, resultando en muchos casos en la aparición tanto de hiperglucemia como de hipoglucemia. Por tanto, los niveles de insulina circulante que se consiguen con las terapias actuales están bastante alejados de los que se obtendrían si las células  $\beta$  funcionasen correctamente. Si bien la terapia con insulina permite a la mayoría de pacientes llevar una vida activa, esta sustitución es imperfecta y afecta en gran manera a su estilo de vida.

El ensayo realizado por el *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) ha mostrado que la terapia intensiva con insulina (tres o más inyecciones diarias) puede retrasar el inicio y la progresión de la retinopatía, nefropatía y neuropatía en pacientes de diabetes tipo 1 (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993). Sin embargo, esta clase de tratamiento no se puede llevar a cabo en todos los pacientes diabéticos, siendo desaconsejable tanto en niños como en personas mayores. Además, pacientes bajo este tratamiento intensivo con insulina presentan un elevado riesgo de hipoglucemia.

#### **5.1.2. Bombas de insulina.**

Una alternativa que cada vez es más utilizada, consiste en la implantación de bombas de insulina subcutáneas, sobretodo en niños y adolescentes. Estas bombas liberan de forma continua unos niveles basales de insulina en una tasa constante. Las infusiones adicionales de insulina deben ser administradas por el propio paciente a

través de un control electrónico. Para la correcta dosificación el paciente tiene que controlar los niveles de glucosa con los procedimientos convencionales. Actualmente se están desarrollando bombas de insulina de “ciclo cerrado” (*closed loop*) que llevan un sensor electrónico de glucosa que permite autoajustar las dosis constantemente, haciendo compatible cualquier tipo de dieta, ejercicio y estilo de vida que lleve el paciente. Esta alternativa se encuentra todavía en fase preliminar de estudio (Jaremko y Rorstad, 1998).

## **5.2. Transplantes.**

Esta aproximación se basa en la realización de transplantes de páncreas (Stratta y col, 1995) o bien, de islotes de Langerhans. El transplante de páncreas, que normalmente se realiza conjuntamente con el transplante de riñón, elimina la necesidad de inyectarse insulina en el paciente y, en muchos casos, de hemodiálisis. La calidad de vida de los pacientes transplantados con éxito está claramente mejorada, y se ha conseguido una tasa de supervivencia al cabo de un año del transplante del 70%. Sin embargo, los transplantes requieren inmunosupresión crónica, y los donantes son muy limitados (Remuzzi y col., 1994; Landgraf, 1996). El transplante de islotes tiene las mismas desventajas (Remuzzi y col., 1994) y adicionalmente presenta un índice de supervivencia de sólo el 20% (Cretin y col, 1998).

## **5.3. Terapia génica.**

Mediante la terapia génica se podría corregir una función anormal o la pérdida de la funcionalidad celular causada por la presencia de un gen mutado a través de la introducción del gen normal. La diabetes mellitus tipo 1, causada por la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas, es una enfermedad candidata para ser curada a través de la terapia génica. Sin embargo, a diferencia de otras enfermedades genéticas humanas que son causadas por mutaciones en un único gen hasta el momento, no se conocen genes alterados en la diabetes tipo 1 cuya sustitución por un alelo normal, a través de aproximaciones de terapia génica, pudiera revertir el proceso diabético (Efrat, 1998; Leibowitz y Levine, 1999).

Actualmente las aproximaciones para la terapia génica de la diabetes están centradas en cuatro grandes áreas :

1) Terapia celular mediante el transplante de células manipuladas genéticamente para que expresen insulina. Así, se podrían transplantar en pacientes diabéticos tipo 1 células

secretoras de insulina derivadas de células  $\beta$  o bien derivadas de otros tipos celulares como células hepáticas o musculares.

2) Reducción de la hiperglucemia diabética mediante un incremento en la captación de la glucosa por el hígado y/o los tejidos periféricos.

3) Desarrollo de mecanismos de prevención de la destrucción autoinmune de las células  $\beta$ , con lo que se podrían salvar tanto los islotes transplantados como los islotes propios de los individuos prediabéticos.

4) Inducción de la regeneración de los islotes de Langerhans. Así, en pacientes con diabetes abierta se podría reemplazar los islotes dañados si al mismo tiempo se pudiese bloquear la autoinmunidad (Efrat, 1998).

### **5.3.1 Terapia celular.**

Gran número de aproximaciones se han centrado en manipular genéticamente células para que produzcan insulina de manera regulada fisiológicamente. Este es un largo camino hacia la obtención de una célula  $\beta$  artificial. Actualmente, diversos grupos están utilizando dos abordajes principales, que incluyen por un lado manipular genéticamente líneas celulares derivadas de insulinomas, y por otro, manipular células no pancreáticas para que produzcan insulina. Un punto clave es conseguir que las células produzcan insulina madura de manera regulada *in vivo*, de manera que secreten suficiente insulina para contrarrestar la hiperglucemia pero que se evite la aparición de episodios de hipoglucemia. Esta aproximación es muy compleja y requerirá mucha investigación antes de la obtención de un “producto” aplicable a pacientes diabéticos (Mitanez y col., 1997; Newgard y col., 1997; Efrat, 1998). Muchos investigadores están centrando sus esfuerzos en la utilización de líneas de células  $\beta$  de roedores transformadas (Efrat, 1998). Sin embargo, una desventaja de la utilización de estas células de insulinoma en humanos es el hecho de que producen insulina de rata o ratón, aunque algunas (como las células RIN de insulinoma de rata) se han manipulado genéticamente para que produzcan también insulina humana (Newgard, 1994). Además, muchas de estas células presentan una producción de insulina reducida y han perdido la respuesta normal a los secretagogos, como glucosa o aminoácidos. Recientemente, se han obtenido líneas celulares derivadas de las RIN mediante transfección con combinaciones de genes que codifican para la insulina humana, el transportador de glucosa GLUT2 y glucoquinasa (Clark y col., 1997; Hohmeier y col., 1997; Tiedge y col., 2000), las cuales presentan un incremento en el contenido de insulina y una respuesta mejorada a la glucosa y sus potenciadores. Como principales inconvenientes, estas líneas celulares presentan inestabilidad fenotípica, desdiferenciación y manifiestan tendencia a la secreción de insulina en respuesta a concentraciones subfisiológicas de



glucosa. Las líneas celulares derivadas de insulinomas de animales son las más utilizadas. En cambio, las líneas celulares derivadas de insulinoma humano son muy poco utilizadas debido a dificultades para mantenerlas en cultivo durante largos períodos de tiempo. Sin embargo, se ha caracterizado una nueva línea celular que podría representar un buen modelo de estudio (Baroni MG, 1999).

Otra aproximación que está siendo desarrollada para la terapia génica de la diabetes tipo 1, es la manipulación genética de líneas celulares no endocrinas como hepatocitos, mioblastos, fibroblastos para que produzcan únicamente insulina humana (Valera y col, 1994; Kolodra y col, 1995; Simpson y col, 1995; Simonson y col, 1996; Gross y col, 1997, 1999; Falqui y col, 1999). Así, la síntesis de insulina en células derivadas de mioblastos de ratón conlleva al descenso de la glucemia en animales diabéticos tratados con Stz (Gross y col, 1999). No obstante, en esta aproximación debe obtenerse una producción de insulina madura de manera regulada. La glucosa es la señal que pone en marcha la síntesis y secreción de insulina en un individuo no diabético. Para ello, la glucosa debe ser transportada hacia el interior de la célula  $\beta$  y ser metabolizada (Newgard y McGarry, 1995). El mayor obstáculo para la expresión ectópica de insulina, es la dificultad de reconstruir el sistema tan altamente regulado de secreción de insulina existente en la célula  $\beta$  normal en las líneas celulares no derivadas de células  $\beta$ .

Dada la similitud con el sistema secreción de insulina de las células  $\beta$ , se han manipulado también células neuroendocrinas, como las AtT-20 de ratón o las GH3 de rata, pero presentan una gran desventaja ya que, además de insulina, producen niveles elevados de hormona adrenocorticotropa (ACTH) (Moore y col, 1983; Kaufmann y col, 1993). Ello limitaría su uso en clínica, ya que podrían provocar la aparición de síndrome de Cushing. Por tanto, se debe tener en cuenta la posibilidad de que una secreción continuada de hormonas u otras proteínas endógenas de algunas de estas líneas celulares podría causar severos trastornos en los pacientes transplantados con estas células (Efrat, 1998).

Una nueva tecnología que tiene mucho potencial, es la de diferenciación de células  $\beta$  a partir de células pluripotenciales (células stem). En un estudio recientemente publicado, se consiguió la generación de islotes pancreáticos *in vitro* a partir de células endoteliales de conductos pancreáticos aisladas provenientes de ratones NOD adultos. Posteriormente, estos islotes fueron transplantados a ratones NOD a los que se les había suspendido el tratamiento con insulina; con la consecuente recuperación de la normoglucemia (Ramiya y col, 2000). Otro estudio muestra que células productoras de

insulina derivadas de células pluripotenciales embrionarias de ratón son también capaces de normalizar la glucemia en ratones con diabetes inducida por estreptozotocina (Soria B y col, 2000). No obstante estos importantes hallazgos, aún queda mucho por investigar antes de que puedan ser considerados para la aplicación clínica. Problemas como la disponibilidad de “stem cells” en páncreas adulto humano, la pérdida de funcionalidad que se ha observado en islotes cultivados a largo plazo (Beattie y col, 1999), o el rechazo inmune que sería similar al de islotes transplantados de otro donante (Mitanchez D y col, 1997), así como el continuo ataque autoinmune al que se verían expuestos, limitan el potencial de estos islotes cultivados en la cura de la diabetes. Además, hay que tener en cuenta que para generar islotes inmunológicamente compatibles con humanos, se necesitaría obtener “stem cells” a partir de embriones humanos clonados lo que plantea aspectos éticos muy debatidos (Lanza RP y col, 1999).

Recientemente un estudio *in vivo* demuestra que la transferencia del gen PDX-1 mediada por adenovirus al hígado de ratón resulta en la conversión de hepatocitos a células  $\beta$  (Ferber S y col, 2000). Estos ratones sobreviven a la diabetes inducida por estreptozotocina y llegan a normalizar la glucemia. La expresión de PDX-1 en hepatocitos puede tener dos efectos. Por un lado estimular la expresión del gen de la preproinsulina, con la consecuente producción de la hormona inmadura. La segunda posibilidad estriba en que menos del 1% de los hepatocitos se haya diferenciado en células  $\beta$ , con la inducción de las convertasas PC1 y PC3 conllevando al completo procesamiento de la proinsulina. Sin embargo, permanecen muchos aspectos por investigar, como la respuesta secretora frente a glucosa o la extensión de la diferenciación. Además queda por determinar si los hepatocitos diferenciados representan un nuevo blanco para la destrucción autoinmune (Kahn A, 2000). No obstante, este hallazgo abre una ventana hacia nuevas aproximaciones entre la terapia celular, la terapia génica y los trasplantes.

### **5.3.2. Incremento de la captación de glucosa.**

Se han diseñado diversos modelos animales a fin de estudiar que combinación de genes permitiría incrementar la captación de glucosa por hígado, músculo y demás tejidos periféricos. Se sabe que el transporte y la fosforilación de la glucosa son los pasos iniciales para la utilización de la glucosa. En el hígado, la fosforilación de la glucosa por la glucoquinasa (GK) parece ser clave en la regulación de la utilización de la glucosa. Al contrario que las otras hexoquinasas, la GK presenta una  $K_m$  para la glucosa elevada (5-8 mM) y su actividad no se inhibe por concentraciones fisiológicas de glucosa-6-P (Iynedjian, 1993; Printz y col, 1993). Durante la diabetes, la expresión

de la GK es muy baja y por tanto, el hígado es incapaz de metabolizar la glucosa sanguínea (Iynedjian, 1993; Printz y col, 1993). Se ha observado que la expresión de GK en células de hepatoma, que carecen de expresión de GK endógena, resulta en una inducción en la captación glucosa y acumulación de glucógeno (Valera y Bosch, 1994). Por otra parte, se ha observado en ratones transgénicos que expresan el gen quimérico PEPCK/GK en hígado que la GK es capaz de controlar la utilización y acumulación de glucosa *in vivo* en este tejido. Además, estos animales transgénicos presentan una tolerancia a la glucosa incrementada y una glucemia e insulinemia inferiores a la de los animales control (Ferre y col, 1996a). Además, al tratarlos con estreptozotocina, la expresión de GK es capaz de contrarrestar la hiperglucemia diabética (Ferre y col, 1996b). También, se han observado niveles bajos de glucemia e insulinemia en ratones transgénicos que sobreexpresan GK en músculo esquelético (Otaegui P y col, 2000). También, muestran glucemias más reducidas después de un tratamiento con Stz y mantienen el peso corporal. Así, estos estudios sugieren que manipular genéticamente el hígado o el músculo esquelético con el fin de expresar GK, podría ser una buena aproximación para reducir la hiperglucemia diabética y por tanto, para desarrollar aproximaciones de terapia génica para la diabetes.

### **5.3.3. Prevención del ataque autoinmune.**

La mejor aproximación para el tratamiento de la diabetes tipo 1 radicaría en la identificación de las personas con un mayor riesgo de contraer la enfermedad, cuyo tratamiento consistiría en prevenir el daño al islote. Para ello se requiere el desarrollo de métodos altamente sensibles para diagnosticar las personas prediabéticas y un mejor conocimiento de los mecanismos de la destrucción autoinmune de la célula  $\beta$ . Aunque se ha observado que un gran número de genes están implicados en la autoinmunidad, no está claro si alguno de ellos juega un papel esencial en el inicio de la respuesta autoinmune (Tisch y McDevitt, 1996; Yoon y col, 1999). Sin embargo, en la actualidad no es posible predecir con seguridad si un individuo va a desarrollar o no la enfermedad. La capacidad de predicción recae en la región HLA y la detección de algunos anticuerpos, pero sólo ofrecen una estimación del riesgo, ya que muchos individuos que portan haplotipos de riesgo en el grupo HLA, nunca llegan a desarrollar la enfermedad. Por otra parte, los autoanticuerpos sólo se detectan una vez ha comenzado la destrucción de las células  $\beta$ .

Una vez que el paciente ya padece una diabetes abierta, cualquier aproximación terapéutica, bien sea trasplante de islotes, implante de células  $\beta$  artificiales, generación de células  $\beta$  por diferenciación de hepatocitos, etc. estará continuamente amenazada con

la destrucción autoinmune. Con la finalidad de preservar los islotes del ataque autoinmune se han llevado a cabo distintas aproximaciones para inducir tolerancia.

Así pues, cualquier protocolo terapéutico, bien sea la prevención antes del desarrollo de la enfermedad o el tratamiento una vez ya se encuentra completamente establecida, requeriría ingeniería genética de la autoinmunidad tanto para prevenir el proceso patológico como para preservar la supervivencia de las nuevas células productoras de insulina. A continuación se presentan algunos de los hallazgos más significativos en distintos niveles de intervención de la respuesta inmune.

#### *5.3.3.1. Inducción de tolerancia.*

Diversas líneas de investigación coinciden en señalar que la diabetes tipo 1 es una enfermedad cuyos orígenes residen en el fallo de la tolerancia central y periférica frente moléculas específicas de la célula  $\beta$ . La presencia de células T en los islotes (insulitis) en los inicios de la enfermedad, y las altas titulaciones de anticuerpos anti-islotes en el suero de animales y humanos diabéticos avalan esta hipótesis.

Así, con el fin de preservar los islotes del daño inmunológico, el primer nivel de intervención considera la inducción de la tolerancia. En este sentido, se han adoptado como modelos de diabetes tipo 1 a los ratones NOD y las ratas BB, ambos con una inmunopatología muy similar a la de humanos (Rossini A y col, 1999). Así, en ratones NOD, la expresión de proinsulina modulada por el promotor de MHC clase II, resulta en la producción de insulina en el timo con la consiguiente prevención de diabetes tipo I (French MB y col, 1997). De forma similar, la inyección de extractos de islotes en el timo de ratones NOD y ratas BB previene el desarrollo de la enfermedad (Posselt AM y col, 1992; Koevary SB y col, 1992; Charlton B y col, 1994). En estos estudios se sugiere que la tolerancia es el resultado de la eliminación de timocitos reactivos para islotes. También, se han conseguido los mismos resultados mediante la inyección intratímica de la cadena B de la insulina y la proteína GAD65, siendo ambos, probables autoantígenos en la diabetes tipo 1 (Cetkovic-Cvrlje M y col, 1997). Además, se ha conseguido la tolerancia de islotes transplantados en ratas inyectando extracto de células de médula ósea del donante en el timo del receptor (Posselt AM y col, 1992); así como con la inyección intratímica de antígenos del MHC clase I (Oluwole SF y col, 1994). Recientemente, se ha demostrado que ratones NOD que expresan las moléculas no diabetogénicas del MHC clase II en lugar de las diabetogénicas I-A<sup>g7</sup> no llegan a desarrollar diabetes (Singer SM y col, 1998). Estos estudios sugieren que la inducción de la tolerancia y la supresión de la autoinmunidad se pueden conseguir en el timo con

la eliminación de los timocitos que reconocen los antígenos de las células  $\beta$ . Por tanto, mediante ingeniería genética se podrían diseñar vectores que codificasen para autoantígenos e inyectarlos en el timo de los individuos que tienen alto riesgo de desarrollar diabetes tipo 1.

#### *5.3.3.2. Modificación de la presentación de antígenos.*

Otro nivel de intervención considera la activación y función de las células presentadoras de antígenos (APC) en los islotes. Así, las APC residentes en los islotes de Langerhans que incluyen macrófagos y células dendríticas son células diana para la incorporación de genes manipulados.

Uno de los eventos iniciales en la activación de macrófagos en islotes humanos y murinos es la producción de IL-1 $\beta$  (Lacy PE y col, 1994). Así pues, se ha demostrado que la transferencia *in vitro* del gen de la proteína antagonista del receptor para la IL-1 $\beta$  (IRAP) en islotes humanos puede prevenir tanto los daños metabólicos que sufre la células  $\beta$  expuesta a IL-1 $\beta$ , así como la apoptosis mediada por Fas y la producción de NO (Giannouskakis N y col, 1999). Otro potente regulador de la actividad de las APC es el TNF- $\alpha$ . Ratones NOD transgénicos que expresan receptores solubles de TNF- $\alpha$  secretado por células  $\beta$  no llegan a desarrollar insulinitis ni diabetes (Hunger y col, 1996; Hunger y col, 1997). Otra posibilidad de intervenir en la actividad de los macrófagos, está representada por el factor de transcripción nuclear NF-kB. La expresión de citoquinas y las moléculas de adhesión están bajo el control de este factor (Ghivizzani SC y col, 1998). Un inhibidor fisiológico de NF-kB es el factor I-kB el cual se le une en el citoplasma e impide su translocación al núcleo. Así, la transfección del gen del represor I-kB mediada por adenovirus a islotes humanos, los protege de la destrucción mediada por IL-1 $\beta$  (Giannouskakis N y col, 2000).

#### *5.3.3.3. Apoptosis y supervivencia de las células $\beta$ .*

El término apoptosis ha sido utilizado como muerte celular individual, tanto si está dirigida por factores internos como externos. Esta muerte celular es lo que se esperaría de una célula que ha llegado al final de su vida, una condensación y fragmentación del núcleo y citoplasma y un rápido desarrollo de los cuerpos apoptóticos por parte de las células vecinas. Un aspecto que permanece sin resolver es cómo la apoptosis se pone en marcha de forma específica en las células seleccionadas para morir. La apoptosis está controlada por distintas vías de señalización que convergen en una única vía final (Steller H y col, 1995). Así, la apoptosis se puede provocar en distintos puntos de la

cascada dependiendo del estímulo y del tipo celular (Martin J, 1993). Las señales que inducen apoptosis son muy variadas y en muchos casos las mismas señales pueden inducir también diferenciación y proliferación (Hale AJ, 1996). Las vías implicadas en el proceso apoptótico son las siguientes:

- 1) El sistema Fas (también conocido como APO-1 o CD95)
- 2) La vía de las proteína/tirosina quinasas
- 3) La vía de las serina/treonina quinasas
- 4) La vía de Ras
- 5) La vía de la proteína quinasa C (PKC)
- 6) La señalización del calcio
- 7) La vía de las ceramidas
- 8) La acción de los radicales libres

Existen dos familias de genes especialmente importantes en el control de la apoptosis: los genes que codifican para la enzima convertidora de la IL-1 $\beta$  (ICE) conocidas también como caspasas y la familia del protooncogen Bcl-2. La forma como todos estos mecanismos engranan entre sí para producir finalmente la muerte celular, aún no es perfectamente conocida, ya que cada día se descubren nuevos factores involucrados.

La apoptosis en células  $\beta$  puede ser inducida de varias formas. Una de las vías más importantes y en la que más investigaciones se han realizado la constituye la vía de la apoptosis mediada por Fas e inducida por TNF- $\alpha$ . En esta vía, intervienen las caspasas, las cuales son comunes intermediarias de muchas vías, e incluso llegan a constituir las últimas ejecutoras de la muerte de la célula. Fas induce la apoptosis cuando se une a su ligando FasL. Sin embargo, se ha sugerido que FasL tiene la capacidad tanto de inducir apoptosis como de prevenirla. Otra vía muy importante la constituyen la activación de los miembros de la familia de Bcl-2. Así, los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2: Bid, Bim, Harikari, Noxa, Bax, Bak y otros, se oligomerizan e insertan en la membrana mitocondrial liberando el citocromo c (Eskes y col, 2000), el cual se une a la proteína Apaf-1 (Cain y col, 2000), la cual desencadena una serie de activaciones de proteínas, fundamentalmente de las caspasas -9 y -3 que terminan en la inducción de apoptosis. Por otra parte, las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x bloquean la apoptosis al impedir la liberación del citocromo c (Newmeyer y col, 2000).

En este sentido, diversos experimentos *in vitro* e *in vivo* han planteado la posibilidad de inhibir la apoptosis de las células  $\beta$  mediante la modulación de las vías más importantes. Así, se ha observado que islotes transplantados a ratones que expresan FasL soluble sobreviven por mucho más tiempo (Leibowitz y col, 1999). Sin embargo,

previamente se habían obtenido resultados contrarios en un estudio en el que los islotes de ratón transfectados con FasL sufrieron infiltración neutrofílica y su consecuente destrucción (Kang SM y col, 1997). Así, queda demostrado que la variante soluble de FasL confiere protección contra apoptosis mientras que, en la forma de molécula unida a la membrana, la apoptosis se induce (Suda T y col, 1997). Además, la apoptosis inducida por la expresión de FasL en membrana puede ser inhibida mediante la proteína Bcl-2. Así, se ha observado que la expresión *in vitro* de Bcl-2 confiere protección antiapoptótica a células  $\beta$  frente al “cocktail” proapoptótico compuesto por las citoquinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Kawahara A y col, 1998).

La producción de NO también parece ser clave en la señalización de apoptosis en células  $\beta$ . Así, la apoptosis producida en células RINm5F mediante IL-1 $\beta$ , esta precedida por la producción de óxido nítrico (NO), y la inhibición de iNOS en estas células previene la muerte por apoptosis (Ankarcrona M y col, 1994). Por otra parte, se ha descrito que la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se expresa en células  $\beta$  y macrófagos durante la insulinitis en los ratones NOD y las ratas BB (Rothe H y col, 1994; Rabinovitch y col, 1996). Además, algunos estudios *in vivo* en modelos animales de diabetes tipo 1 han mostrado un retraso o prevención de la aparición de la enfermedad, al ser tratados con bloqueantes de la óxido nítrico sintasa (NOS). Se sabe que las citoquinas median la síntesis de NO que puede causar apoptosis en macrófagos y fibroblastos. Las células  $\beta$  pancreáticas han mostrado ser susceptibles a apoptosis. Esta es la forma como se reduce la masa de células  $\beta$  en el post-parto (Scaglia L y col, 1995) y en los islotes transplantados.

La apoptosis también es la forma de muerte celular en varios modelos animales que desarrollan diabetes, como ratones NOD y en las ratas BB (Yoon y col, 1998). También, el método más utilizado de inducción experimental de diabetes, que consiste en la administración de múltiples bajas dosis de estreptozotocina, la cual destruye las células  $\beta$  mediante el mecanismo de apoptosis (O'Brien BA y col, 1996).

#### **5.3.4. Regeneración de islotes.**

A pesar de los esfuerzos por combatir el desarrollo de la diabetes antes de que la destrucción de los islotes haya culminado, en la gran mayoría de los casos, la enfermedad es diagnosticada cuando la destrucción autoinmune se encuentra ya muy avanzada. Por tanto, la terapia ideal ha de conferir la capacidad de “curar” un páncreas dañado, extinto de células  $\beta$  y que de ser repuestas, estarían constantemente amenazadas por el sistema inmunitario. Por ende, la cura tendría que ser el resultado de dos efectos

combinados: la generación de nuevas células  $\beta$  y su protección contra la destrucción autoinmune.

La generación de nuevas células  $\beta$  en el páncreas de un individuo adulto puede parecer imposible. Sin embargo, un concepto biológico básico, muchas veces ignorado es que los islotes como todas las células tienen un tiempo de vida finito, con lo cual es de esperar que haya un recambio. Durante la vida del individuo esta regulación depende en forma directa del correcto balance de la masa de células  $\beta$ . Los mecanismos a través de los cuales se mantiene este delicado equilibrio se traducen en, replicación de células  $\beta$  preexistentes, neogénesis de células  $\beta$  y muerte celular programada o apoptosis de las células que hayan cumplido su ciclo vital. Tales cambios ocurren a lo largo de toda la vida del individuo, con el desarrollo, el crecimiento, el envejecimiento, así como también durante la gestación, la obesidad y otros cambios que incrementan la demanda funcional del islote. A continuación se presentan los hallazgos más significativos en los mecanismos de neogénesis y replicación (el mecanismo de apoptosis se ha presentado previamente).

#### *5.3.4.1. Neogénesis de células $\beta$ .*

Se denomina nesidioblastosis, al proceso definido morfológicamente como la neogénesis de células endocrinas que se originan por diferenciación de las células epiteliales de los conductos (Pictet R y col, 1972; Cantenys D, 1981). Durante la vida fetal, cerca de un 80% del total de células que se generan lo hacen mediante diferenciación de células endoteliales. Después del nacimiento, se ha postulado que la replicación es el principal medio de expansión de las células  $\beta$  diferenciadas (Hellerström C, 1988; Sweene I, 1992).

En la vida adulta las células  $\beta$  están altamente diferenciadas. A pesar de ello, en el adulto el epitelio de conductos pancreáticos puede ser estimulado para inducir neogénesis. Un incremento en la tasa de neogénesis se ha conseguido en varios modelos experimentales. Estos modelos incluyen: ratas parcialmente pancreatectomizadas (Bonner-Weir y col, 1993), ratas pancreatectomizadas tratadas con un inhibidor de la sintasa de poli-ADP-ribosa (Terazono K y col, 1988), hamsters en los que se ha realizado un ligamiento del páncreas (Rosenberg L y col, 1983), o ratas con conductos pancreáticos ligados (Wang RN, 1995). Sin embargo, estos modelos no son adecuados para la correcta evaluación de factores específicos involucrados en la regeneración de las células  $\beta$ , ya que muchos de estos factores pueden también estar siendo estimulados por el proceso de regeneración del páncreas exocrino. También, se han obtenido



animales transgénicos que sobreexpresan IFN- $\gamma$  en células  $\beta$  (Gu y col, 1995). Estos animales son capaces de recuperar la normoglucemia, así como el peso corporal después de ser tratados con Stz. Puede que esta mejoría se deba a la regeneración del páncreas, ya que los ratones transgénicos presentaban una tasa de neogénesis más elevada que sus análogos control. Sin embargo, los nuevos islotes crecen de forma ectópica en los conductos. Resultados similares se han obtenido en animales que sobreexpresan TGF- $\alpha$  conjuntamente con gastrina en células  $\beta$  (Wang TC y col, 1993).

Además de los modelos experimentales previamente mencionados, en los que se ha inducido neogénesis, esta también se puede dar de forma espontánea en el adulto. En la rata, a los 20 días de gestación, la masa total de células  $\beta$  aumenta por encima de un 50% respecto a hembras no gestantes (Scaglia y col, 1993). Tres días después del parto, comienza la involución del número de células  $\beta$  mediante apoptosis. Por otra parte, se ha observado neogénesis en pacientes con pancreatitis crónica (Klöppel G y col, 1978). También, se ha descrito neogénesis de células  $\beta$  a partir de células de conductos en pacientes diabéticos de reciente aparición (Gepts W y De Mey J, 1978). Incluso en pacientes diabéticos tipo 1 a largo plazo se ha observado, numerosos islotes con células que son inmunoreactivas para PP. Este hallazgo es muy interesante, ya que el PP es estructuralmente muy cercano a NPY, y este último ha sido propuesto como marcador de células precursoras de islotes (Gepts W y De Mey J, 1978; Löhr M, 1987). Así, la neogénesis de islotes es quizás un intento del organismo para compensar la pérdida de células  $\beta$  que está sufriendo, pero por alguna razón desconocida este proceso fracasa y se detiene.

#### *5.3.4.2. Replicación de células $\beta$ .*

Respecto al mecanismo de replicación, algunos autores piensan que es el principal medio de expansión después del nacimiento, pero con una capacidad que disminuye con la edad (Hellerström C, 1988; Sweene I, 1992). Como los islotes adultos muestran muy pocas células mitóticas y muy bajos índices de incorporación de análogos de timidina (BrdU), comúnmente se han considerado que no son capaces de crecer. Sin embargo, en algunos modelos *in vitro* e *in vivo* con islotes de ratones neonatos y adultos se ha demostrado lo contrario, encontrándose que unos y otros responden de manera similar a la mayoría de los estímulos. Diversos estímulos han sido identificados: glucosa, miembros de la familia de la hormona de crecimiento (GH), y varios factores de crecimiento.

La capacidad inductora de replicación de la glucosa se identificó como estímulo *in vivo*, en 1938 cuando Woerner demostró que se producía un aumento de la masa de islotes en cobayas después de una infusión continua de glucosa. Usando un modelo similar en ratas adultas, se encontró que una infusión continua de glucosa durante 96 h resultaba en un incremento de alrededor del 50 % de células  $\beta$  y que tanto la hipertrofia de células individuales como la hiperplasia estaban involucradas. (Bonner-Weir y col, 1989). En cultivo, también se observó una respuesta de replicación dosis-dependiente a la glucosa, no obstante los índices obtenidos fueron mucho menores que en los experimentos *in vivo*. Por ejemplo, en islotes de adultos en cultivo solo un 0.85% de células por hora se replicaban en un medio que contenía glucosa 33.3 mM contrastando con los islotes de neonatos (1 semana), que se replicaban con un índice de 1.8% (Hellerstrom y col 1988, Swenne 1992). Utilizando marcaje específico, para distinguir las células  $\beta$  de otras células en monocapas de células de islotes adultos, se ha observado que la respuesta máxima de replicación de células  $\beta$  /4h es del 1% a 16.7 mM de glucosa, lo cual es diez veces mayor que el índice observado en condiciones basales (a 5mM) de glucosa (Schuppín y col, 1992). En islotes fetales la estimulación de la glucosa sobre el crecimiento de estos es un evento tardío y se hace evidente a partir del día 22 (Swenne, 1992). Esta maduración lenta de la capacidad replicativa como la respuesta frente a glucosa es paralela a la biosíntesis de insulina inducida por glucosa; la cual se produce poco después del nacimiento. Dado que la glucosa es un fuerte estímulo tanto *in vitro* como *in vivo*, tal vez el metabolismo de la glucosa en células  $\beta$  juegue un papel clave en la regulación de la división de células  $\beta$ .

Miembros de la familia de la GH y otros factores estimuladores del crecimiento están también involucrados en los procesos de división celular. Los primeros estudios *in vivo* se han centrado en el periodo de gestación, ya que el incremento en la demanda metabólica durante este estado se compensa con cambios a nivel de respuesta secretora de insulina y también con un aumento de la masa de células  $\beta$ . En la rata, a los 20 días de gestación, la masa total de células  $\beta$  ha aumentado por encima de un 50% respecto a hembras no gestantes (Marynissen y col, 1983). Se han observado tanto el incremento en replicación como el aumento del volumen de los islotes (Bonner-Weir y col, 1995). Los incrementos en la replicación de células  $\beta$ , así como el aumento en la secreción de insulina están directamente relacionados con la aparición de la secreción de lactógeno placentario (PL), (Parsons y col 1983). Otro modelo *in vivo* lo constituye la rata BB (*mammosomatotropic-tumor-bearing rat*), en la cual la hipersecreción de GH y prolactina (PRL) resulta en una marcada hiperplasia de células  $\beta$  (Parsons y col, 1983). Debido a que GH, PRL y la PL son antagonistas a la acción de la insulina y causan resistencia a la insulina, su efecto sobre las células  $\beta$  se ha considerado indirecto. Sin

embargo, se ha conseguido la estimulación de la síntesis del DNA en islotes en cultivo como efecto directo de la adición de estas hormonas (Brelje y col 1993). La hGH (GH recombinante humana) tiene un marcado efecto estimulador en la replicación de islotes de ratas en cultivo, incrementando su tasa basal por islote unas cinco veces en un período de 4 meses. Los receptores para GH y PRL están presentes en páncreas, islotes y células  $\beta$ . La efectividad de la estimulación tanto en la replicación de la célula  $\beta$  como en la secreción de insulina está en el orden PL>PRL>>GH. Cuando se incubaron islotes de rata adulta con hPL, rPL, hPRL, rPRL, hGH y rGH, se observó que la replicación de las células  $\beta$  aumentaba una media de 15 veces en todos los casos excepto en presencia de rGH. Este péptido tiene muy poco efecto mitogénico (Schuppín y Bonner-Weir 1993). Por tanto, la GH de primates que tiene efecto tanto somatogénico como lactogénico. El papel de la GH parece ser muy complicado ya que en muchos tejidos está mediado por IGF-I, el cual aparentemente se sintetiza en islotes en cultivo de adultos y neonatos. Sin embargo no está del todo claro si esta producción la realizan las células endocrinas o células contaminantes del tejido exocrino y células endoteliales. Se han realizado muchos estudios inmunohistoquímicos que han localizado IGF-I en los islotes, sin embargo ninguno de ellos descarta la posibilidad de que el anticuerpo utilizado haya podido tener actividad cruzada con la molécula de proinsulina, con la cual IGF-I comparte regiones de alta homología. Mediante hibridación *in situ*, sólo se ha conseguido detectar mRNA de IGF-I en las células endoteliales (Smith y col, 1991). Los efectos del IGF-I y su papel como mediador de GH no son claros. En diversos estudios se ha encontrado la GH no conduce a un aumento en la síntesis de IGF-I en islotes (Nielsen y col, 1992; Billestrup y Nielsen 1991). En cambio, otros autores han revelado que sí (Swenne y col 1987). Si fuese el caso que la GH ejerciera sus acciones principales a través del receptor de PRL/PL, no cabría esperar una dependencia de IGF-I.

También se han encontrado diversos factores de crecimiento que inducen la replicación de las células  $\beta$ . Así, se ha observado que IGF-I induce la proliferación *in vitro* de las células  $\beta$  en cultivo y que esta inducción es dependiente de glucosa (Hügl SR y col, 1998). Otros factores que también afectan la replicación de la célula  $\beta$  son PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), que se ha visto que dobla la incorporación de timidina en islotes fetales siendo además este efecto aditivo a la estimulación producida por IGF-I; HGF (*hepatocyte growth factor*) cuya expresión en ratones transgénicos RIP/HGF, conllevan a un incremento en la tasa de replicación dando como resultado un aumento de 2-3 veces de la masa de célula  $\beta$  respecto al valor normal (García-Ocaña A, 2000), y IGF-II que sobreexpresado en células  $\beta$  de ratones transgénicos da lugar a un marcado incremento en la masa de células  $\beta$  (Devedjian JC y col, 2000).

## **6. EL FACTOR DE CRECIMIENTO SEMEJANTE A LA INSULINA I.**

### **6.1. Estructura y síntesis.**

Los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGFs) pertenecen a una familia de péptidos que comprende la insulina, el IGF-I y el IGF-II. Estas tres hormonas peptídicas tienen en común el 50% de aminoácidos. La estructura de la insulina demostrada por Frederick Sanger en 1953 es bien conocida. Está formada por dos cadenas, una  $\alpha$  de 21 y otra  $\beta$  de 30 aminoácidos unidas covalentemente mediante dos enlaces disulfuro. En la síntesis se parte de una única cadena, pero pierde un péptido C de 30 aminoácidos y quedan dos cadenas separadas. La estructura de los IGFs es muy similar, aunque conservan la cadena única con el péptido C de unión y además presentan en el extremo carboxiterminal un dominio D que no tiene la insulina (Daughaday y col, 1989).

El IGF-I está compuesto por 70 aminoácidos y se le predice un peso molecular de 7,6 KDa, mientras el IGF-II posee 63 residuos y un peso molecular de 7,4 KDa (Van den Brande y col., 1990). La alta homología que comparten, sobre todo en los aminoácidos más conservados, permite suponer una estructura terciaria muy próxima a la insulina manteniendo el núcleo hidrofóbico de ésta, así como los puentes disulfuro (Blundell y col., 1978, 1983; Honegger, 1985).

La insulina tiene una vida media de minutos y circula en concentraciones del orden de picomolar. Por otra parte IGF-I circula a concentraciones mucho mayores del orden de nanomolar, unido a alguna de las seis proteínas de unión (IGFBPs) que modulan su actividad (Jones y col, 1995). El principal órgano de producción de IGFs como de sus proteínas de unión es el hígado, aunque también son sintetizados en la mayoría de los tejidos en donde actúan de forma autocrina o paracrina.

### **6.2. Papel fisiológico y mecanismo de acción.**

La insulina actúa principalmente en el hígado, músculo y tejido adiposo (Kahn CR, 1985), mientras que los IGFs ejercen sus acciones en prácticamente en todo el organismo (Kahn CR, 1985; Daughaday y col, 1989). Ambos IGFs son esenciales en el desarrollo embrionario (Baker J y col., 1993) y se mantienen en circulación en concentración nanomolar durante la vida adulta. Después del nacimiento, IGF-I juega el papel predominante mientras que se desconoce el significado fisiológico de IGF-II.

Partiendo de la idea de que los IGFs tienen acciones semejantes a la insulina, los primeros estudios de unión competitiva demostraron que aunque el IGF-I y el IGF-II se unen débilmente al receptor de esta hormona, éstos poseen sus propios receptores de alta afinidad (Hintz y col., 1972; Marshal y col., 1974 y Zapf y col., 1978). La estructura de cuatro subunidades unidas por puentes disulfuro del receptor de la insulina se dedujo gracias al método de unión cruzada por afinidad. Por este mismo método se pudo conocer la estructura similar del receptor del IGF-I, también denominado de tipo 1 (Massagué y Czech, 1982). Este receptor tiene la mayor afinidad por el IGF-I y una afinidad unas 10 veces menor por el IGF-II. La insulina es con diferencia la que se une en menor grado, con una afinidad 100 veces menor a la del IGF-I. Los receptores tipo 2, por lo contrario, no están estructuralmente relacionados con el receptor de la insulina, se unen con alta afinidad al IGF-II, 10 veces menos al IGF-I y no se detecta unión a la insulina. Los estudios realizados hasta el momento indican que este receptor de tipo 2 no está involucrado en la mediación de las acciones propiamente conocidas de los IGFs de tipo metabólico y de control de la proliferación y diferenciación, que se atribuyen al receptor de tipo 1 (Esquema V).

Los pasos intermedios del proceso de traducción de señal que se conocen hasta el momento del IGF-I son compartidos por la insulina actuando a través de su receptor. Estos implican el IRS-I (insulin receptor substrate-I) y la fosfatidilinositol 3-quinasa (Ruderman y col., 1990), p21<sup>ras</sup> (Jhun y col., 1994), así como la Map2 quinasa y la S6 quinasa ribosomal que se activan en células tratadas con uno u otro efector (Hoshi y col., 1988; Sturgill y col., 1988).

A pesar de estas similitudes, la insulina y el IGF-I tienen, a través de sus propios receptores, diferentes papeles fisiológicos. La primera está más involucrada en la regulación del metabolismo y el segundo en el crecimiento y desarrollo. Esto puede ser debido más a la distribución celular que a diferencias fundamentales de su modo de acción. Así, aunque muchos tejidos expresan ambos receptores, se observa que los tejidos metabólicos como hígado y adiposo, conocidas dianas de insulina, tienen muchos receptores de insulina y muy pocos o ninguno de IGF-I. Mientras, por el contrario, los fibroblastos y las células  $\beta$  del páncreas contienen fundamentalmente receptores de IGF-I (Flier y col., 1986; Van Schravendijk y col., 1990).

**Esquema V. Acciones metabólicas, de proliferación y diferenciación que se atribuyen a los receptores para la insulina y los factores de crecimiento semejantes a la insulina I y II.**

Algunos investigadores han sugerido que el IGF-I está involucrado en el crecimiento del páncreas tanto exocrino como endocrino, ya que IGF-I estimula la diferenciación y proliferación de las células  $\beta$  (LeRoith D, 1997). Se ha sugerido que la capacidad proliferativa de IGF-I está mediada por IRS-2 (Zhang Q y col, 1998; Hugl SR y col.,1998). Por otra parte, tras pancreatectomía parcial en ratas adultas, se ha observado neogénesis de islotes y replicación de islotes residuales. Estos cambios coinciden con un marcado incremento en la expresión del gen de IGF-I (Smith FE y col, 1991; Hayakawa H y col, 1996). Por tanto, estos resultados sugieren que IGF-I induce la diferenciación de células epiteliales de conductos pancreáticos a células  $\beta$  (Bonner-Weir y col, 1993). Asimismo, otro estudio realizado en perros sometidos a pancreatectomía parcial ha revelado un aumento en los niveles de mRNA de IGF-I así como en la síntesis del péptido en las zonas de regeneración. Estos resultados se corresponden con un fuerte aumento de la síntesis de DNA en el páncreas remanente (Hayawaka H y col, 1996).

Además de sus acciones diferenciadoras y proliferativas, IGF-I es también un potente factor antiapoptótico y su acción ha sido comprobada en distintos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, se ha demostrado que IGF-I protege los islotes contra la

inhibición de la secreción de insulina mediada por IL-1 $\beta$ , la estimulación de la formación de NO y la apoptosis (Mabley JG, 1997). En la inhibición de la apoptosis, IGF-I actúa a nivel de diversas vías de activación. Por un lado, se ha observado que el papel antiinflamatorio y antiapoptótico de IGF-I en células  $\beta$  pancreáticas es dependiente de la activación de PI3K (fosfatidil inositol 3 quinasa), que a su vez activa la proteína quinasa B/Akt, la cual previene la apoptosis (Kauffman-Zeh A, 1997). Se ha observado que el efecto anti-apoptótico de IGF-I en otros tipos celulares además de estar mediado por la activación de PI3K, también lo está a través MAP quinasa (Párrizas M y col, 1997). Por otro lado, se ha observado que IGF-I también protege los islotes de rata frente a la apoptosis inducida por citoquinas y mediada por Fas (Harrison M y col, 1998). Además, se ha comprobado el efecto antiapoptótico de IGF-I en la línea de células  $\beta$  de rata Ins-1, frente al efecto de lipoprotein lipasa (LPS) e INF-  $\gamma$ , los cuales estimulan la expresión del gen de la sintasa de NO tipo 2 (NOS-2) (Castrillo A, 2000). En este trabajo se demostró, que el importante papel antiapoptótico de IGF-I en las células  $\beta$  pancreáticas previene tanto la apoptosis mediada por NOS como la independiente de NO y que IGF-I actúa en ambas vías en un punto común: activando la PI3K. Asimismo, estudios *in vivo* han revelado que la administración de rhIGF-I en ratones NOD previene parcialmente la insulinitis y el desarrollo de diabetes (Bergerot I y col, 1995).

Por sus efectos a nivel de los tres mecanismos que regulan la masa de células  $\beta$ , neogénesis, proliferación y apoptosis, IGF-I podía representar un gen candidato a tener en cuenta para el estudio de la regeneración pancreática en la diabetes mellitus tipo 1. Para estudiarlo, en este trabajo se ha utilizado una línea de animales transgénicos que expresan IGF-I en las células  $\beta$  del páncreas, obtenida previamente en nuestro laboratorio.

### **III. OBJETIVOS**



El objetivo general de este proyecto fue estudiar de una nueva aproximación de terapia génica para la diabetes tipo 1 centrada en la regeneración del páncreas endocrino, utilizando para ello animales transgénicos que sobreexpresan IGF-I específicamente en células  $\beta$ .

Dado que se había observado que:

- el IGF-I incrementaba la proliferación de células  $\beta$  *in vitro*.
- el IGF-I protegía a los islotes frente a la inhibición mediada por citoquinas de la muerte celular por apoptosis.
- la expresión de IGF-I aumentaba en las áreas de regeneración tras pancreatectomía parcial.
- el receptor de IGF-I se acoplaba al IRS-2 en el islote pancreático para mediar el desarrollo, la proliferación y la supervivencia de las células  $\beta$ .

Este factor de crecimiento muy probablemente podría inducir la replicación y formación de nuevas células  $\beta$  *in vivo*, y, al mismo tiempo, evitar la destrucción autoinmune de los nuevos islotes recién formados.

Por tanto, este objetivo general lo dividimos en los siguientes objetivos parciales:

- 1) Estudiar el papel del IGF-I en la regeneración de la masa de células  $\beta$  y en la normalización de los parámetros metabólicos, tras inducción de diabetes experimental, utilizando animales transgénicos de background genético C57Bl6/SJL.
- 2) Estudiar el papel del IGF-I en la regeneración de la masa de células  $\beta$  y en la normalización de los parámetros metabólicos, tras inducción de diabetes experimental, utilizando animales transgénicos de background genético CD-1, altamente susceptibles a desarrollar insulinitis.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **1. RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN IGF-I EN CÉLULAS $\beta$**

En este trabajo se utilizó una línea de ratones transgénicos de la cepa C57B16/SJL, que expresaba IGF-I de forma específica en células  $\beta$  del páncreas bajo el control del promotor de insulina de rata I (RIP-I) (Tesis Doctoral, C. Costa, 1995). Análisis inmunohistoquímicos del páncreas de los ratones control y transgénicos demostraron que únicamente los islotes de los transgénicos producían IGF-I (Fig. 1).

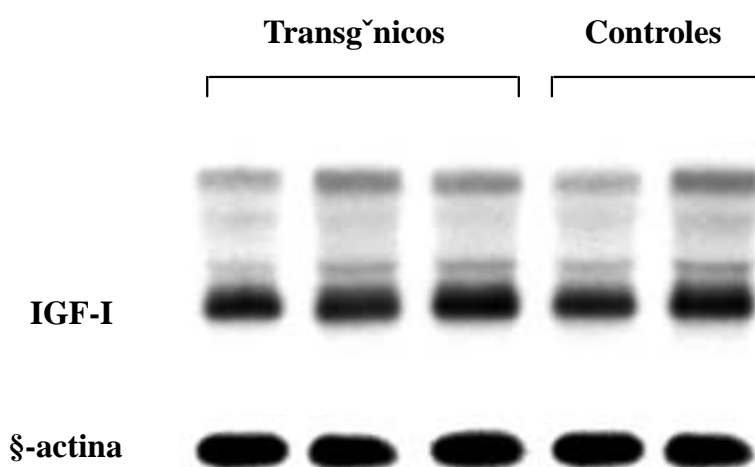
**Figura 1. Análisis inmunohistoquímico de la presencia de IGF-I en los islotes pancreáticos.** Se determinó de la presencia de IGF-I en islotes de ratones controles y transgénicos con anticuerpo anti-IGF-I en cortes histológicos de páncreas (x 100).

Estos ratones transgénicos de 6-8 semanas de edad, eran normoglucémicos y normoinsulinémicos (Tabla I). También, presentaban niveles de IGF-I circulante similares a los de los animales control y valores normales de ácidos grasos libres (NEFAS) y triglicéridos (Tabla 1).

	Controles	Transgénicos
Glucosa (mg/dl)	141 $\pm$ 6	140 $\pm$ 4
IGF-I (ng/ml)	231 $\pm$ 15	228 $\pm$ 12
Insulina ( $\mu$ U/ml)	30 $\pm$ 3	30 $\pm$ 2
Triglicéridos (mg/dl)	129 $\pm$ 8	132 $\pm$ 10
NEFAS (mmol/l)	0,9 $\pm$ 0,05	1,0 $\pm$ 0,05

**Tabla I. Parámetros séricos de los ratones transgénicos que espresan IGF-I.** Los niveles circulantes de glucosa, IGF-I, insulina, triglicéridos se determinaron en ratones control y transgénicos de 6 semanas de edad como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 31 ratones controles y 32 transgénicos.

El IGF-I circulante es producido en el hígado (Le Roith D, 1997). Así, pudimos observar que los ratones transgénicos no presentaban diferencias en la expresión hepática de este factor de crecimiento al analizarlo mediante Northern Blot (Fig. 2). Dado que las células  $\beta$  contienen receptores de IGF-I (Van Schravendijk CF y col, 1987) estos resultados indicaban que el IGF-I producido en las células  $\beta$  pancreáticas actuaba muy probablemente de manera autocrina o paracrina en el islote.



**Figura 2. Expresión del gen endógeno del IGF-I en hígado.** Se determinó mediante análisis por Northern Blot la expresión del gen de IGF-I en RNA total de hígado. Se presenta un Northern blot representativo hibridado con sonda específica para IGF-I y corregido con  $\beta$ -actina.

Asímismo, al realizar un test de tolerancia a la glucosa no se observaron diferencias significativas entre ratones control y transgénicos (Fig. 3). Todos estos resultados indicaban que los ratones transgénicos no presentaban alteraciones en la homeostasia de la glucosa como consecuencia de la expresión de IGF-I en las células  $\beta$ .

**Figura 3. Test de tolerancia a la glucosa de los ratones transgénicos.** Ratones transgénicos (n=12) y controles (n=10) alimentados, de 6 semanas de edad, fueron anestesiados con Avertín y sometidos a un test de tolerancia a la glucosa. Se determinó la glucemia mediante el analizador Glucometer Elite™ en los tiempos indicados. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM.

## **2. EVALUACIÓN DE LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS TRAS INDUCCIÓN DE DIABETES EXPERIMENTAL.**

Como ya se ha indicado en la introducción, se ha descrito que el IGF-I es capaz de incrementar la proliferación de células  $\beta$  pancreáticas *in vitro* (Hügl, S y col, 1998), así como puede proteger a los islotes en cultivo de la destrucción mediada por citoquinas (Mabley J y col, 1997; Harrison M y col, 1998; Castrillo A y col, 2000). Por otra parte, los ratones transgénicos que sobreexpresan IGF-I en células  $\beta$  no presentan alteraciones metabólicas, ni histológicas. Además, tampoco presentan diferencias en los niveles de IGF-I circulantes respecto a ratones control. Por tanto, el IGF-I producido por las células  $\beta$  actuaba de forma paracrina/autocrina en el páncreas. Así pues, estos animales podrían representar un modelo muy adecuado para estudiar la posibilidad de regenerar los islotes pancreáticos tras la inducción experimental de diabetes.

Para la inducción de diabetes, se utilizó estreptozotocina (Stz), un antibiótico que deriva del *Streptomyces achromogenes*. La estreptozotocina es una molécula constituida por una N-metil-N-nitrosurea unida al C-2 de la D-glucosa. El mecanismo de toxicidad sobre la célula  $\beta$  se da a través del reconocimiento de transportadores de glucosa Glut-2. La parte glucosada de la molécula es la que dirige la entrada a las células que tienen este sistema de transporte.

Ratones transgénicos y controles de 6 semanas de edad fueron inyectados intraperitonealmente con 5 dosis bajas de estreptozotocina (50 mg/Kg) durante 5 días consecutivos. Este tratamiento se conoce como MLD Stz (multiple low doses of Streptozotocin) e induce infiltración linfocitaria de los islotes (insulitis) que lleva al desarrollo de diabetes mellitus tipo 1 (Rossini A y col, 1977). Sin embargo, la intensidad de la insulitis depende de la cepa de ratón. Además, este tratamiento con Stz

induce la expresión de citoquinas en los islotes (Huang X y col, 1994) y la muerte de células  $\beta$  por apoptosis (O' Brien B y col, 1996). También, el tratamiento con STZ induce la formación de radicales libres y óxido nítrico (NO) en el islote (Turk J y col, 1993), los cuales están directamente involucrados en la destrucción de la célula  $\beta$ .

El estudio que se presenta a continuación, se centró en determinar si los animales transgénicos eran capaces de recuperarse de la inducción experimental de diabetes. Para ello, se realizó un seguimiento de las glucemias e insulinemias de estos animales a largo plazo, así como un seguimiento de la supervivencia y los pesos corporales.

### **2.1. Análisis de las glucemias de los animales tratados con Stz.**

Se determinaron las glucemias en animales controles y transgénicos siempre a la misma hora y en estado de alimentación a partir de muestras de sangre obtenidas de la cola del animal (Fig. 4).

La primera determinación de glucemia se realizó el día 1 cuando los animales aún no habían recibido la primera dosis de Stz. Como se había descrito anteriormente (Tabla I), no se observaron diferencias en los valores de glucosa sanguínea entre animales controles y transgénicos (Fig. 4). Seguidamente, se comenzó a administrar las dosis de Stz; el día 1, la primera; el día 2 la segunda y así sucesivamente hasta completarse 5 dosis consecutivas.

Dos semanas después de iniciado el tratamiento con Stz, los ratones controles mostraron un marcado aumento en la glucemia, cerca de 500 mg/dl; mientras que los transgénicos únicamente habían incrementado sus valores de glucemia cerca de 240 mg/dl. Un mes después del tratamiento, los ratones control mostraron concentraciones de glucosa sanguínea superiores a 600 mg/dl (el nivel máximo de medición). A pesar de que los ratones transgénicos se hicieron hiperglucémicos después del tratamiento con Stz, los niveles de glucosa sanguínea no superaron los 300 mg/dl y permanecieron con

glucemias elevadas aproximadamente 2 meses, pero recuperaron progresivamente los valores normales (Fig. 4). El seguimiento de las glucemias de los animales control se llevó a cabo sólo durante 4 meses, ya que ninguno de ellos sobrevivió a este período (Fig. 5). En cambio, en el caso de los animales transgénicos las glucemias se analizaron durante 8 meses (Fig. 4).

## **2.2. Tasa de supervivencia en animales tratados con Stz.**

El signo más evidente de que los transgénicos reaccionaban favorablemente a la agresión del tratamiento con Stz en relación a los controles se observó al analizar la tasa de supervivencia. Así el 100% de los ratones transgénicos sobrevivieron al tratamiento con Stz. En cambio, los animales controles no superaron los 4 meses de vida tras el tratamiento con Stz (Fig. 5).

**Figura 4. Evolución de la glucemia en los ratones transgénicos y controles sometidos al tratamiento con Stz.** En los días indicados se determinó la glucemia a partir de sangre de la vena caudal mediante el analizador Glucometer Elite™. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 19 animales control y 21 transgénicos.

**Figura 5. Estudio a largo plazo de la tasa de supervivencia después del tratamiento con Stz.** Resultados obtenidos a partir de 21 animales transgénicos y 19 animales controles.

### **2.3. Análisis de las concentraciones séricas de IGF-I e insulina.**

Con la finalidad de determinar los cambios en los niveles de IGF-I e insulina circulantes, se analizaron muestras de suero de animales transgénicos y controles el día antes del tratamiento con Stz (tiempo 0) y a los 30 y 90 días después del tratamiento. El análisis se hizo mediante la técnica de radioinmuno ensayo (RIA) y se analizaron entre 12 y 15 animales por cada tiempo indicado.



Se observó que antes del inicio de la administración de las dosis de Stz, los niveles circulantes de IGF-I eran similares entre ratones control y transgénicos. Sin embargo, al cabo de 30 días tras el tratamiento con Stz, los ratones controles experimentaron una disminución de estos valores de alrededor del 50%. En cambio, los ratones transgénicos presentaban valores normales de IGF-I circulante (Fig. 6A). La disminución en los niveles séricos de IGF-I que presentaban los animales control se considera un signo característico de la diabetes mellitus, en la cual se observan alteraciones en el eje hormona de crecimiento/IGF-I. Así, se ha observado que la mayoría de pacientes diabéticos tipo 1 presentan resistencia a la hormona de crecimiento a nivel hepático, con el consiguiente aumento de los niveles séricos de la hormona y una disminución en la concentración de IGF-I circulante (Le Roith D, 1997).

Paralelamente, se determinaron los valores séricos de insulina. Antes de iniciarse el tratamiento con Stz, no se observaron diferencias significativas en la insulinemia entre ratones control y transgénicos. Sin embargo, al cabo de 1 mes los animales control experimentaron un fuerte descenso (66%) en los niveles séricos de insulina. Los ratones transgénicos también sufrieron un descenso del 30% en los niveles circulantes de la hormona. Sin embargo, tres meses después del tratamiento, los ratones control mantenían niveles muy bajos de insulina sérica mientras que los ratones transgénicos habían recuperado la normoinsulinemia (Fig. 6B).

#### **2.4. Cambios en el peso corporal de los ratones transgénicos sometidos al tratamiento con Stz.**

También se analizaron los cambios en el peso corporal en los animales sometidos al tratamiento con Stz (Fig. 7). Los ratones transgénicos hiperglucémicos no ganaron peso en relación a los controles sanos (Fig. 7). Sin embargo, después de la normalización de la glucemia, el peso corporal aumentó y tres meses más tarde era equiparable al de

ratones control de la misma edad no tratados con Stz (Fig. 7). Por contra, los ratones controles tratados con Stz mostraron una drástica pérdida de peso (Fig. 7).

**Figura 6. Determinación de los niveles séricos de IGF-I e insulina.** Los niveles séricos de IGF-I (A) y de insulina (B) en animales transgénicos (barras negras) y controles (barras blancas) se determinaron a distintos tiempos tras el tratamiento con Stz. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 15 ratones control y 15 transgénicos para cada tiempo indicado.

Se ha de considerar que en el caso de los controles el número de animales disminuyó progresivamente con el tiempo y que sólo se presentan los datos de los animales que sobrevivieron. Por tanto, aunque aparentemente el peso de los animales control parezca mantenerse constante, en realidad estos animales iban experimentando una gran pérdida de peso (reducción del 25%) y a continuación perecían. En cambio, los animales transgénicos con la recuperación de la normoglucemia incrementaron el peso corporal, lo cual indicaba que eran capaces de contrarrestar las alteraciones diabéticas.

**Figura 7. Seguimiento del peso corporal de los ratones transgénicos y controles sometidos al tratamiento con Stz.** Se pesaron en los tiempos indicados ratones control sanos (triángulos) (n=10), ratones controles tratados con Stz (cuadrados) (n=10 y ratones transgénicos tratados con Stz (círculos) (n=15). Todos los valores se expresan como la media  $\pm$ SEM. \*p<0.05 (*versus* ratones controles tratados con Stz).

## **2.5. Análisis inmunohistoquímico del páncreas de los animales tratados con Stz.**

Después de realizar un análisis inmunohistoquímico con los anticuerpos anti-IGF-I, anti-insulina y anti-glucagón en páncreas de animales controles y transgénicos tratados con Stz, se observaron marcadas diferencias. Antes del tratamiento con Stz, se pudo observar islotes esféricos con inmunoreactividad similar para la insulina y el glucagón en los islotes de los animales transgénicos y controles (Fig. 8B,C,E,F). También se pudo apreciar que el IGF-I era detectable únicamente en los islotes transgénicos pero no en los de los controles (Fig. 8A,D). Tres meses después del tratamiento con Stz, los animales controles presentaban muy pocos islotes, los cuales mostraban cierto grado de insulitis y una gran pérdida de células productoras de insulina dando como resultado una fuerte reducción en el número de células  $\beta$  (Fig. 8H). En cambio, los ratones transgénicos presentaban islotes con morfología normal (Fig. 8K). Además, en estos animales se observaba con frecuencia células  $\beta$  aisladas o en grupos muy reducidos dispersos en el parénquima pancreático. Por otra parte, en las preparaciones de los animales transgénicos se observaban también células  $\beta$ , asociadas a los conductos, lo que indicaba que estos animales tendrían probablemente una tasa de neogénesis más alta que sus análogos controles (Fig.9). Ello estaría de acuerdo con el hecho que los conductos pancreáticos de animales adultos conservan células pluripotenciales con capacidad de diferenciarse en células endocrinas del páncreas y generar así un nuevo islote (Bonner-Weir S, 1995).

**Figura 8. Análisis inmunohistoquímico en ratones controles y transgénicos antes y después del tratamiento con Stz.** Anticuerpos: anti-IGF-I (A,D,G,J), anti-insulina (B,D,H,K) y anti-glucagón (C,F,I,L).

**Figura 9. Presencia de células  $\beta$  asociadas a conductos.** Se utilizó el anticuerpo anti-insulina y se observó numerosas células positivas pertenecientes a los conductos. Se presenta un conducto representativo (x1000).

## **2.6. Análisis morfométrico del páncreas de los animales tratados con Stz.**

Dado que tras el tratamiento con Stz los ratones transgénicos habían recuperado los niveles de glucosa sanguínea, y que además, esto ocurría paralelamente a la normalización de la insulinemia, se procedió a determinar si ello era el resultado de la recuperación de la masa de células  $\beta$  en el páncreas de estos animales.

Con el fin de determinar la masa de célula  $\beta$ , se realizó un análisis morfométrico del páncreas en dos grupos de animales. El primer grupo estaba formado por animales sanos; es decir, ratones transgénicos y controles no tratados con Stz. El segundo grupo, estaba formado por animales controles y transgénicos, 90 días después de ser sometidos a la inducción de diabetes experimental con Stz.

En primer lugar se obtuvo la masa de células  $\beta$  totales. Para ello, las células  $\beta$  se marcaron con un anticuerpo anti-insulina. Se utilizaron 18 cortes seriados de páncreas de animales controles y transgénicos antes y después de ser sometidos al tratamiento con Stz. Posteriormente, se determinó el área de los cortes histológicos de páncreas, analizados con ayuda de un sistema de imágenes acoplado a un microscopio óptico. De la misma forma, también se determinó el área correspondiente a las células  $\beta$ . La conversión de área de células  $\beta$  totales/área de páncreas total a masa de células  $\beta$ , se realizó multiplicando el peso del páncreas por el % de área de células  $\beta$ .

Al realizar este estudio, no se observaron diferencias significativas entre animales controles y transgénicos sanos (Fig. 10A). En cambio, a los tres meses tras el tratamiento con Stz, se apreciaron notables diferencias entre animales controles y transgénicos. La masa de células  $\beta$  de los controles tratados con Stz se había reducido en un 80 % respecto al valor inicial. En cambio, los ratones transgénicos sólo habían perdido un 35 % de masa de célula  $\beta$  total inicial (Fig. 10A). Se ha descrito que para que aparezca hiperglucemia diabética, un animal debe perder alrededor del 70% de las células  $\beta$ . Por tanto, aunque los ratones transgénicos tratados con Stz presentaban una masa de células  $\beta$  muy superior al 20 % (65% del valor inicial), cabía suponer que en el momento en que estos animales eran hiperglucémicos (un mes tras el tratamiento con Stz), su masa de células  $\beta$  se encontraba aún más disminuída. Por otra parte, la normalización de la glucemia en estos animales, indicaba que el 65% de la masa de

células  $\beta$  inicial era suficiente para producir la insulina necesaria para lograr la homeostasia de la glucosa.

En segundo lugar, se analizó la masa de células  $\beta$  neogénicas. En este estudio se determinó de la misma manera que en el caso de la masa de células  $\beta$  total. No obstante, únicamente se consideró la masa de las células positivas para insulina asociadas a conductos pancreáticos (ver Materiales y Métodos).

Así, a la edad de 6 semanas, antes del inicio del tratamiento con Stz, la masa de células  $\beta$  asociadas a conductos (neogénicas) era similar en animales controles y transgénicos (Fig. 10B). Al cabo de 90 días tras el tratamiento con Stz, los ratones control mantuvieron baja la masa de células  $\beta$  neogénicas. Sin embargo, 90 días tras el tratamiento, los ratones transgénicos experimentaron un marcado incremento de alrededor 7 veces respecto al que presentaban antes del inicio del tratamiento (Fig. 10B). Ello indicaba que estos animales tenían una tasa de neogénesis más alta que sus análogos controles. Por tanto, la expresión de IGF-I en células  $\beta$  ponía en marcha un mecanismo de diferenciación de células endoteliales de los conductos hacia células  $\beta$  endocrinas.

Los resultados obtenidos en este estudio indicaban que los animales transgénicos compensaban de alguna manera la destrucción de las células  $\beta$  provocada por la Stz, ya que la masa de células  $\beta$  total en estos animales estaba más elevada que en los animales control. Por otra parte, nuestros resultados sugerían que esta compensación podía deberse a un incremento en la neogénesis, ya que se observaba un incremento muy acentuado en la masa de células  $\beta$  neogénicas.

Así pues, los resultados de esta primera parte del estudio mostraron que los ratones transgénicos sometidos a la inducción de diabetes experimental, eran capaces de recuperar la normoglucemia y la normoinsulinemia. Sin embargo cabe destacar, que los animales transgénicos nunca alcanzaron los elevados niveles de glucosa ni los bajos niveles de insulina circulante que llegaron a manifestar los controles diabéticos. Por otra parte, los animales transgénicos mantenían una elevada masa de células  $\beta$  totales tres meses tras el tratamiento. Ello probablemente era el resultado del incremento de

neogénesis, que muy probablemente, conjuntamente con un incremento en la replicación de las células  $\beta$  preexistentes, estaría compensando parcialmente la destrucción de las células  $\beta$  por efecto de la Stz. Estos resultados parecían indicar que por un lado la producción de IGF-I en células  $\beta$ , protegía estas células de la destrucción provocada por la Stz y al mismo tiempo llevaba a un incremento en la masa de células  $\beta$ .

**Figura 10. A) Masa de células  $\beta$ .** Se determinó la masa de células  $\beta$  pancreáticas de ratones transgénicos (barras negras) (n=5) y ratones control (barras blancas) (n=5) antes y 3 meses después del tratamiento con Stz. Se analizaron 18 secciones seriadas de cada páncreas. **B) Masa de células  $\beta$  neogénicas.** Se determinó la masa de células  $\beta$  que se encontraban asociadas a



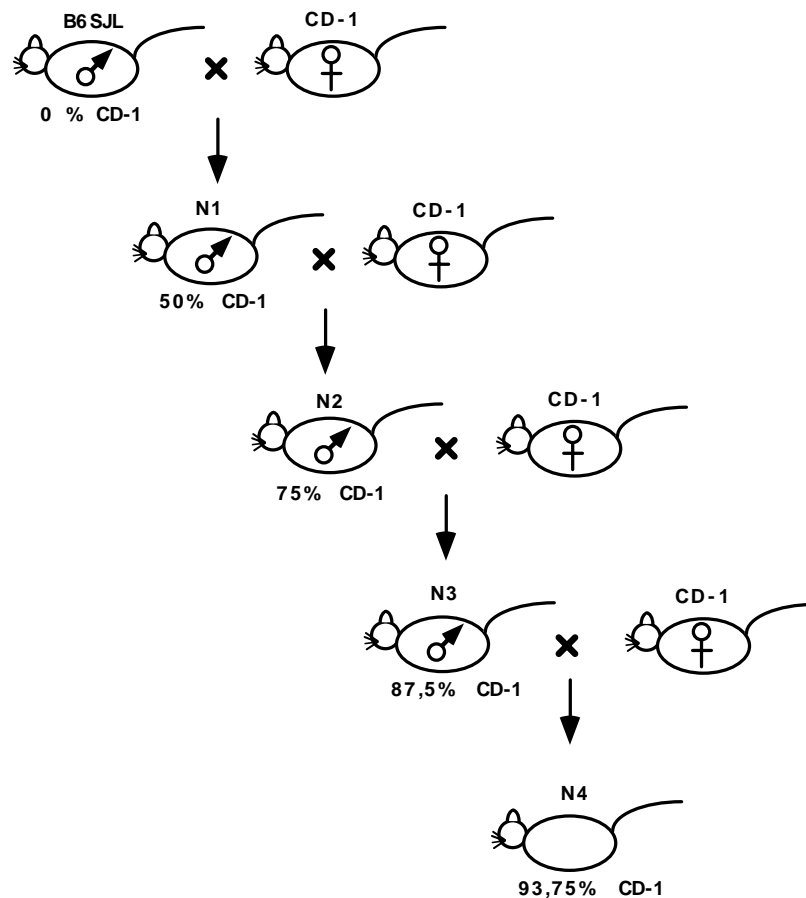
conductos de páncreas en las mismas secciones anteriores. Se llevó a cabo el análisis estadístico usando el test Student-Newmann-Keuls. \* $p < 0.05$  (*versus* ratones controles tratados con Stz).

### **3. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE ANIMALES TRANSGÉNICOS CONGÉNICOS CON LA BACKGROUND GENÉTICO CD-1.**

Se ha descrito, que la diabetes mellitus tipo 1 es el resultado de la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas. Este proceso está caracterizado por el desarrollo de insulinitis, ocasionada por la infiltración de linfocitos T dentro de los islotes pancreáticos. En pacientes humanos, la insulinitis se ha observado desde los primeros estadios de la diabetes hasta momentos alejados del inicio de la enfermedad. Por ello, se hacía imprescindible validar la capacidad protectora/proliferativa del IGF-I en una cepa de ratón más susceptible a desarrollar insulinitis.

Dado que se había descrito en la bibliografía que la cepa de ratón C57B16/SJL en la que se obtuvieron inicialmente los ratones transgénicos era genéticamente más resistente a desarrollar insulinitis (Rossini A y col, 1977), se procedió a la obtención de una segunda colonia de animales transgénicos en “background” genético CD-1. Esto se consiguió mediante retrocruzamiento de animales transgénicos de la cepa original con la cepa CD-1. Esta cepa es más susceptible a desarrollar insulinitis, mostrando un desarrollo de la patología más similar a la diabetes tipo 1 en humanos que la cepa anterior (Rossini A y col, 1977).

Por tanto, se obtuvieron animales transgénicos que expresaban IGF-I en célula  $\beta$  en background genético CD-1. Para ello, se cruzaron machos transgénicos en la cepa C57B16/SJL con hembras de la cepa CD-1. La descendencia obtenida de la primera generación (N1) presentaban el 50% de los genes de la cepa CD-1. Machos transgénicos de la generación N1 se cruzaron a continuación con hembras CD-1. De esta manera se obtuvo una segunda generación N2 que contenía el 75% de los genes de la cepa CD-1. Nuevamente se escogieron machos transgénicos de la generación N2 y se cruzaron con hembras CD-1, así se obtuvo la generación N3, que contenía un 87,5% de los genes de la cepa CD-1. Finalmente, se cruzaron estos machos con hembras CD-1 y se obtuvo la generación N4, con una presencia del 93,75% de genes de la cepa CD-1. Esta generación N4 de background CD1 fue la que se utilizó en los estudios que se presentan a continuación.



**Figura 11. Obtención de ratones transgénicos congénicos con la cepa CD-1.** Representación esquemática de los retrocruzamientos realizados para obtener ratones transgénicos con el “background” genético de la cepa CD-1, que es más susceptible a desarrollar diabetes.

### 3.1. Análisis de la glucemia en estado de alimentación y ayuno de los animales transgénicos N4 CD-1 tratados con Stz.

Un mes después del tratamiento con bajas dosis de Stz (5 dosis de 50 mg/Kg en días consecutivos), tanto los ratones controles como los transgénicos presentaban una marcada hiperglucemia, alcanzando valores de glucosa sanguínea alrededor de los 600 mg/dl (límite máximo de detección) (Fig. 12). Sin embargo, alrededor de 2.5 meses más tarde, las glucemias del 70% de los ratones transgénicos tratados con Stz comenzó a descender lentamente y hacia los 3 meses después del tratamiento habían alcanzado valores cercanos a 200 mg /dl (Fig. 12). A partir de entonces, estos animales mantuvieron la normoglucemia tanto en estado postprandrial como de ayuno (Fig. 12 y

13). El 30% restante de los ratones transgénicos tratados con Stz también se recuperaron de la elevada hiperglucemia, aunque más lentamente, llegando a alcanzar valores de glucemia de  $350\pm 20$  mg/dl en estado postpandrial y  $110\pm 15$  mg/dl en ayuno, a los 6 meses del tratamiento. Cabe destacar, que ninguno de los ratones transgénicos murió, llegando incluso a sobrevivir más allá del año tras el tratamiento con Stz. En el caso de los controles tratados con Stz, estos animales presentaban niveles de glucemia que sobrepasaban el nivel máximo de medición (600mg/dl) (Fig. 12 y 13). Además, a los tres meses de haberse realizado el tratamiento con Stz se determinaron las glucemias de los animales transgénicos y controles, tras 12 horas de ayuno. Se observó que los animales transgénicos eran completamente normoglucémicos, mientras que los controles eran marcadamente hiperglucémicos (Fig. 13). Ninguno de estos animales controles diabéticos sobrevivió a los 4 meses del tratamiento.

**Figura 12. Seguimiento de la glucemia de los ratones transgénicos y controles sometidos al tratamiento con Stz.** Se determinó la glucemia mediante el analizador Glucometer Elite™ en los días indicados. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 20 animales controles y 12 transgénicos.

### **3.2. Determinación de las concentraciones séricas de insulina en animales transgénicos de la cepa CD-1 tratados con Stz.**

Con la finalidad de determinar los niveles de insulina circulantes en los animales CD-1, se analizaron muestras de suero de animales transgénicos y controles el día antes del tratamiento (tiempo 0) y a los 21 y 120 días después del tratamiento con Stz.

**Figura 13. Niveles de glucosa sanguínea en ayunas.** Tras un ayuno de 12 horas, se determinó la glucemia (mediante el analizador Glucometer Elite™) de los ratones transgénicos y controles 3 meses después del tratamiento con Stz.. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 10 animales por grupo. \*\* $p < 0.01$ . (*versus* ratones controles tratados con Stz)

Tres semanas después del tratamiento con Stz tanto los animales controles CD-1 como los transgénicos mostraron una disminución del 60% en los niveles de insulina circulante (Fig. 14). Sin embargo, tres meses después de la inducción de diabetes, se

observó una normalización de la insulinemia en los ratones transgénicos tratados con Stz. Por contra, la insulinemia de los controles seguía mostrando valores muy bajos (reducción de más del 75%) (Fig. 14).

Estos resultados indicaban que durante las primeras semanas post-tratamiento con Stz, tanto los controles como los transgénicos sufrían un descenso abrupto de la insulinemia, muy probablemente como consecuencia de la pérdida de células  $\beta$  debido al efecto de la Stz, lo cual estaría de acuerdo con los niveles de glucemia de estos animales durante este período. Sin embargo, tres meses después, los animales transgénicos eran capaces de recuperar los niveles de insulina y se observaba que este cambio era paralelo con la recuperación de la normogluceemia, lo cual supone que estos ratones transgénicos muy probablemente habrían recuperado la masa de células  $\beta$  (Fig. 14).

**Figura 14. Determinación de los niveles séricos de insulina.** Niveles séricos de insulina en animales controles (barras blancas) (n=8) y transgénicos (barras negras) (n=8) a distintos tiempos tras el tratamiento con Stz. Los resultados que se presentan son la media  $\pm$  SEM. \*p<0.05 (*versus* ratones controles tratados con Stz).

**3.3. Determinación del consumo de agua y comida en animales transgénicos de la cepa CD-1 tratados con Stz.**

Debido a que la diabetes no controlada también trae como consecuencia polifagia y polidipsia, el consumo de agua y comida constituye un parámetro fundamental en la evaluación de la severidad de la enfermedad. Por tanto, se determinaron estos valores en los animales sometidos al tratamiento con Stz con la finalidad de averiguar si estaban alterados y en qué grado.

Un animal sano consume 8 ml de agua al día. Un mes tras el tratamiento con Stz, el consumo de agua aumentó 4 veces en los ratones control respecto al consumo normal en animales sanos (Fig. 15A). De igual forma, los ratones transgénicos también habían incrementado el consumo de agua unas 3 veces (Fig. 15A). A los dos meses, el consumo de agua de los ratones control era aún mayor, observándose un incremento de 6 veces respecto al consumo normal (Fig. 15A). En cambio, los animales transgénicos habían recuperado los valores normales de consumo de agua, lo que reflejaba una mejoría en el estado general de estos animales (Fig. 15A). Finalmente, al cabo de 3 meses tras el tratamiento con Stz, los animales controles mostraban una total descompensación en la regulación de la concentración de glucosa sanguínea, lo que se correspondía con un consumo de agua superior a 10 veces el valor inicial (alrededor de 90 ml/día). Por otra parte, los animales transgénicos mantenían niveles de consumo de agua normales (Fig. 15A).

**Figura 15. Determinación del consumo de agua (A) y comida (B).** Se determinó el consumo de agua y comida a distintos tiempos tras el tratamiento con Stz, en animales transgénicos (barras negras) y controles (barras blancas). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 10 ratones transgénicos y 10 ratones controles. \* $p < 0.05$  (*versus* ratones controles tratados con Stz).

En cuanto al consumo de comida, también se observaron marcadas diferencias entre animales transgénicos y controles. Si bien los animales sanos consumen unos 5 g/día, un mes tras el tratamiento con Stz, el consumo de comida aumentó cerca de un 100%, tanto en los ratones controles como en los transgénicos (Fig. 15B). Posteriormente, a los 2 y 3 meses tras el tratamiento, el consumo de comida continuaba incrementando en los animales control hasta alcanzar unos valores superiores a 3 veces lo que consume un animal sano. Sin embargo, los ratones transgénicos tratados con streptozotocina, al igual que ocurría con el consumo de agua (Fig. 15A), recuperaron los niveles normales de consumo de comida (Fig. 15B).

Estos resultados indicaban que los animales transgénicos conseguían con la normalización de la glucemia y la insulinemia, recuperar los valores normales de consumo de agua y alimento. Por el contrario, los animales control no eran capaces de

estabilizar los valores normales, lo cual estaba de acuerdo con la gran severidad de la diabetes.

### **3.4. Determinación de los parámetros séricos de los ratones transgénicos N4 tras el tratamiento con Stz.**

Una vez observado que los animales transgénicos habían recuperado la normogluceemia tras la inducción experimental de diabetes, se procedió a la determinación de otros parámetros séricos indicadores de las alteraciones diabéticas.

Así, se observó que los animales controles presentaban un incremento muy marcado en los niveles de triglicéridos, NEFAS y 3 veces los niveles de  $\beta$ -hidroxibutirato respecto a un animal control sano (Tabla II). En cambio, los animales transgénicos presentaban valores normales de triglicéridos, ácidos grasos y cuerpos cetónicos, lo que confirmaba la recuperación de estos animales del estado diabético.

**Tabla II. Parámetros séricos en animales CD-1 tras tratamiento con Stz.**

	$\beta$ -hidroxibutirato (mmol/l)	TG (mg/dl)	NEFAs (mmol/l)
<b>Con</b>	0.7 $\pm$ 0.1	160 $\pm$ 17	0.85 $\pm$ 0.1
<b>Stz-Con</b>	2.12 $\pm$ 0.4	237 $\pm$ 46	1.28 $\pm$ 0.13
<b>Stz-Tg</b>	0.66 $\pm$ 0.16 **	144 $\pm$ 22 *	0.91 $\pm$ 0.17 *

\*\* p < 0.01 y \* p < 0.05 vs. ratones controles tratados con Stz.



### **3.5. Test de tolerancia a la glucosa en animales transgénicos tras el tratamiento con Stz.**

Con el fin de determinar la capacidad de metabolizar la glucosa en los ratones transgénicos tratados con Stz, pero recuperados de la diabetes experimental, se les sometió a un test de tolerancia a la glucosa.

Para ello, 3 meses después del tratamiento con Stz, animales transgénicos y controles fueron anestesiados y sometidos a un test de tolerancia a la glucosa en estado de ayuno. Este se realizó mediante una inyección intraperitoneal del azúcar (1 mg/g peso vivo) a tiempo 0 y se llevó a cabo un seguimiento de la glucemia durante 180 minutos.

En cuanto al nivel basal de glucemia, los ratones transgénicos mostraban valores alrededor de 110 mg/dl, mientras que los controles estaban cerca de 450 mg/dl (Fig. 16). Al cabo de 30 minutos tras la administración de glucosa, los ratones transgénicos alcanzaron valores de 450 mg/dl, mientras que los controles mostraban valores superiores de 600mg/dl (Fig. 16). Posteriormente los animales transgénicos recuperaron progresivamente los niveles basales de glucemia. Por el contrario, los controles no fueron capaces de metabolizar el azúcar y permanecieron con niveles muy elevados durante los 180 minutos de duración del test (Fig. 16).

Estos resultados indicaban que los ratones transgénicos tratados con Stz respondían normalmente a una sobrecarga de glucosa. Esta observación es clave para evaluar el grado de recuperación de los animales diabéticos, ya que la principal característica de esta enfermedad es la incapacidad de mantener la homeostasia de la glucosa.

**Figura 16. Test de tolerancia a la glucosa de ratones transgénicos** Se administró una inyección intraperitoneal (i.p.) de 1 mg de glucosa/g de peso a ratones transgénicos (STZ-Tg) y controles (STZ-Con) ayunados 12 horas. Las muestras de sangre se tomaron a partir de la vena caudal. Se determinó la glucemia mediante el analizador Glucometer Elite™ en los tiempos indicados. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 5 ratones transgénicos y 5 control.

### **3.6. Análisis inmunohistoquímico del páncreas a las 2 semanas tras el tratamiento con Stz.**

Dado que los ratones transgénicos conseguían normalizar la glucemia y la insulinemia, así como el consumo de agua y comida, estos resultados sugerían que muy probablemente habrían recuperado la masa de células  $\beta$ . Por tanto, en este estudio nos

propusimos investigar los cambios a nivel histológico que se producían en el páncreas a distintos períodos de tiempo tras la administración de Stz.

Así, en primer lugar se procedió a estudiar los efectos que se producen en los islotes pancreáticos a corto plazo, a las 2 semanas después del tratamiento con Stz cuando los animales eran marcadamente hiperglucémicos. Al realizar un análisis inmunohitoquímico pudimos observar que a diferencia de los páncreas de ratones controles sanos, en los cuales se apreciaban islotes esféricos bien definidos, tanto los páncreas de los ratones controles como el de los transgénicos tratados con Stz mostraban islotes con forma alterada y con gran infiltrado linfocitario (Fig 17). Ello se observó tanto utilizando un anticuerpo anti-insulina (Fig. 17A,B,E,F) como utilizando un anticuerpo anti-glucagón (Fig. 17I, J, L, M).

Puesto que tanto los islotes de los animales control tratados con Stz como el de los transgénicos, mostraban infiltración linfocitaria, se procedió a continuación a analizar la severidad de la misma. Se reconoce como grado 0 de insulitis, cuando el islote esta intacto, es decir, no hay infiltrado linfocitario (Fig. 18A), grado 1 cuando la infiltración del islote es  $< 25\%$  (Fig. 18B), grado 2 cuando el área infiltrada corresponde entre el 25 y 50% del islote (Fig. 18C) y grado 3 cuando el área afectada es  $>50\%$  (Fig. 18D). A pesar de que tanto los islotes de ratones controles como de los transgénicos tratados con Stz presentaban insulitis (Fig.17), el grado de la misma difería entre ambos grupos de animales. Así, los transgénicos presentaron un alto porcentaje de islotes no infiltrados, o con un nivel bajo de infiltración ( $< 25\%$ ) (Fig. 19). En cambio, se observó una insulitis más severa en los ratones control tratados con Stz, ya que la mayoría de los islotes presentaba un alto grado de infiltración (Fig. 19). Estos resultados sugerían que la expresión de IGF-I en células  $\beta$  atenuaba el desarrollo de insulitis, muy probablemente debido a una reducción en la apoptosis por la acción de este factor de crecimiento.



**Figura 18. Criterio para la determinación del grado de insulinitis. Células teñidas con insulina.**

**Figura 19. Determinación del grado de insulinitis.** Se determinó el porcentaje de islotes infiltrados. La severidad de la insulinitis se calculó en base a 25 islotes por cada páncreas analizado con tinción de hematoxilina/eosina en animales controles (barras blancas) (n=5) y transgénicos (barras negras) (n=5). Se reconoce como grado 0 cuando el islote está intacto, grado 1 cuando la infiltración es < 25%, grado 2 cuando el área infiltrada corresponde > 25 y <50% del islote, grado 3 cuando el área afectada es >50%. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. \*p<0.05 (*versus* ratones controles tratados con Stz).

### **3.7. Determinación de la tasa de apoptosis.**

Se ha descrito que la apoptosis, es el mecanismo de muerte celular programada mediante el cual los individuos sanos mantienen el equilibrio de la masa celular. Sin embargo, en pacientes diabéticos está considerado como el mecanismo principal de muerte celular durante el desarrollo de la enfermedad. También se ha descrito a la

apoptosis como la forma de muerte celular en la diabetes provocada por la inyección de cinco dosis bajas consecutivas de estreptozotocina (O' Brien BA y col, 1996)

Por tanto, también se examinó la tasa de apoptosis en los islotes de los animales tratados con Stz a fin de determinar si la expresión de IGF-I en los islotes pancreáticos, los protegía de los efectos oxidativos y apoptóticos de la Stz y por tanto podía explicar en parte las diferencias observadas al determinar el grado de insulinitis.

Por ello, se realizó en páncreas de ratones tratados con Stz una doble inmunohistoquímica con insulina y marcaje con dideoxinucleótidos mediado por la transferasa terminal (TUNEL) (Fig. 20). La técnica de TUNEL permite marcar los núcleos de las células apoptóticas, gracias a la acción de la enzima transferasa terminal. Esta enzima actúa uniendo nucleótidos marcados a los fragmentos rotos del DNA, característica propia del proceso apoptótico. Así, se determinó la tasa de apoptosis en cortes seriados de animales tratados con Stz a los 3, 8, 15 y 30 días después de la última inyección de Stz y en animales sanos (día 0) (Fig. 21). En estas secciones se examinaron un total de 1000 núcleos de células  $\beta$  por animal y se analizaron 3 animales controles y 3 transgénicos en cada caso.

Los animales sanos tanto controles como transgénicos (día 0) no presentaban células  $\beta$  apoptóticas (Fig. 21). Además, no se encontraron diferencias significativas en la tasa de apoptosis entre animales controles y transgénicos analizados el tercer día después de la última inyección (Stz día 3) (Fig. 21). Sin embargo, cinco días más tarde (Stz día 8) la tasa de apoptosis en los animales transgénicos permanecía constante mientras que en los controles se encontraba aumentada respecto a la que presentaban el tercer día. (Fig. 21). En las muestras analizadas de los grupos Stz día 15 y Stz día 30, no se detectaron células  $\beta$  positivas para TUNEL (Fig. 21).

Estos resultados indicaban que a pesar de que los animales transgénicos no eran resistentes a la acción destructiva de la Stz, presentaban un menor grado de apoptosis. Por tanto, IGF-I estaba actuando como factor de supervivencia para las células  $\beta$ .

**Figura 20. Doble inmunohistoquímica Insulina/TUNEL** Se realizó análisis inmunohistoquímico en secciones de páncreas de animales controles y transgénicos. Se utilizó el kit de apoptosis de Roche Molecular y el anticuerpo anti insulina, según se indica en materiales y métodos.(X400)

**Figura 21. Tasa de apoptosis.** Se determinó el porcentaje de células apoptóticas mediante dobles inmunohistoquímicas Insulina / TUNEL en secciones seriadas de páncreas de los ratones controles (n=3) y transgénicos (n=3). Se analizaron 4 secciones de páncreas por animal separadas 50  $\mu$ m entre sí. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM.\*p<0.05 (*versus* ratones controles tratados del grupo Stz día 3)

### **3.8. Análisis inmunohistoquímico del páncreas a los 4 meses tras el tratamiento con Stz.**

A los cuatro meses después del tratamiento con Stz, los animales transgénicos presentaban normoglucemia y normoinsulinemia, lo cual sugería que se habían recuperado del proceso de destrucción de los islotes observado a las 2 semanas del tratamiento con Stz.

Al realizar estudios inmunohistoquímicos con insulina de los páncreas controles se observaron pequeños islotes con unas pocas células  $\beta$  (Fig. 17C,D). Sin embargo, el análisis inmunohistoquímico con glucagón permitió observar numerosas células  $\alpha$  (Fig. 17K). Este resultado probablemente era consecuencia de la disminución de las células  $\beta$  y por tanto de la producción de insulina, lo cual llevaría a la proliferación de las células  $\alpha$ . En cambio, los análisis inmunohistoquímicos con anticuerpos anti-insulina de los páncreas de los ratones transgénicos tratados con Stz revelaron un gran número de islotes sin insulinitis, de tamaño similar al de los islotes de ratones no tratados con Stz (Fig. 17G,H). Además, en el páncreas de estos animales también se observaban pequeños grupos aislados de células positivas para insulina. No obstante, estos islotes presentaban una distribución alterada de las células  $\alpha$ , encontrándose con mayor frecuencia distribuidas en el centro del islote que en la periferia (Fig. 17N). La doble inmunohistoquímica insulina/IGF-I, demostró que las células  $\beta$  de los animales transgénicos que se habían recuperado de la inducción de diabetes experimental continuaban produciendo IGF-I (Fig. 22).



**Figura 22. Análisis inmunohistoquímico de la presencia de IGF-I en animales transgénicos CD-1 tratados con Stz.** Se determinó la presencia de IGF-I, tres meses después del tratamiento con Stz, en islotes de animales transgénicos con anticuerpo anti-IGF-I.(X400).

### **3.9. Análisis morfométrico del páncreas de los ratones transgénicos tratados con Stz.**

Dado que los animales transgénicos presentaban páncreas de aspecto normal y habían recuperado los valores de glucemia e insulinemia, se procedió a determinar si estos cambios eran consecuencia directa del restablecimiento de la masa total de células  $\beta$ .

Con el fin de determinar la masa total de célula  $\beta$ , se realizó un análisis morfométrico del páncreas en dos grupos de animales. El primer grupo estaba formado por animales sanos; es decir, ratones transgénicos y controles no tratados con Stz. El segundo grupo, estaba formado por animales controles y transgénicos, 90 días después de ser sometidos a la inducción de diabetes experimental con Stz. El análisis morfométrico se llevó a cabo tras analizar 18 secciones de páncreas de cada animal. Las células  $\beta$  se marcaron con un anticuerpo anti-insulina. El cálculo de la masa de células  $\beta$  totales se realizó según se indica en Materiales y Métodos.

En primer lugar se obtuvo la masa de células  $\beta$  totales. Al realizar este estudio, no se observaron diferencias significativas entre animales controles y transgénicos sanos (Fig. 23A). En cambio, en el grupo tratado con Stz se apreciaron notables diferencias entre animales controles y transgénicos. La masa de células  $\beta$  de los controles tratados con Stz se había reducido en un 85 % respecto al valor inicial, mientras que los ratones transgénicos sólo habían perdido un 20% respecto a la masa de

célula  $\beta$  total inicial y por tanto, presentaban un incremento de 7 veces respecto a los controles diabéticos (Fig. 23A).

En segundo lugar, se determinó la masa de células  $\beta$  asociadas a los conductos pancreáticos, es decir, células  $\beta$  neogénicas o de nueva formación. Si bien no se apreciaron diferencias entre animales controles y transgénicos antes del inicio del tratamiento, estas se hicieron evidentes tres meses después (Fig 23B). Los animales transgénicos, 90 días tras el tratamiento con Stz, presentaban una masa de células  $\beta$  neogénicas 7 veces mayor que los controles tratados y casi 4 veces mayor respecto a animales controles sanos. Cabe destacar, que se consiguieron las mismas proporciones que cuando se realizaron los análisis morfométricos en ratones de la cepa C57B16/KSJ. Al igual que en el caso anterior, estos resultados indicaban que en estos animales se estaba produciendo un proceso de neogénesis, capaz muy probablemente de recuperar la masa de células  $\beta$ .

### **3.10. Determinación de la tasa de replicación de células $\beta$ en animales transgénicos tras el tratamiento con Stz.**

Además de un aumento en el proceso de neogénesis, el mantenimiento de la masa de células  $\beta$  observado en los ratones transgénicos, también podía deberse a un incremento en la tasa de replicación de estas células. Por tanto, se determinó la tasa de replicación de las células  $\beta$  en animales controles y transgénicos antes y después del tratamiento con Stz. Para ello, se utilizó la técnica de incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina que se incorpora en la cadena recién sintetizada de DNA de una nueva célula. La BrdU se inyectó i.p. (100mg/kg peso) y 8 horas después se sacrificaron los animales. Para determinar la tasa de replicación se realizó una tinción inmunohistoquímica con un “cocktail” de anticuerpos para glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático, a fin de poder diferenciar por descarte las células  $\beta$  del resto de células endocrinas. También, se realizó un análisis inmunohistoquímico con el anticuerpo para la BrdU para diferenciar los núcleos

replicantes. Además, se realizó una tinción con fluorescencia con un anticuerpo anti-insulina y así corroborar que la determinación de células positivas para BrdU se realizaba efectivamente sobre células  $\beta$  (Fig. 24).

**Figura 23. A) Masa de células  $\beta$ .** Se determinó la masa de células  $\beta$  pancreáticas de ratones transgénicos (barras negras) (n=5) y ratones control (barras blancas) (n=5) antes y 3 meses después del tratamiento con Stz. Se analizaron 18 secciones seriadas de cada páncreas. **B) Masa de células  $\beta$  neogénicas.** Se determinó la masa de células  $\beta$  que se encontraban asociadas a conductos de páncreas en las mismas secciones anteriores. \*\*p<0.01 (*versus* ratones controles tratados con Stz).

Una vez realizadas las tinciones inmunohistoquímicas se contaron los núcleos positivos para la BrdU respecto al total de núcleos positivos para la insulina y se representaron en % de células  $\beta$  positivas para BrdU. En el caso de animales no tratados con Stz, en el tercer y octavo día después del tratamiento se contaron un total de 1000 - 1200 núcleos, mientras que en las muestras de los animales 2 meses post-tratamiento, la

tasa fue calculada a partir de 200 núcleos por páncreas, debido al escaso número de células  $\beta$  supervivientes en los animales control.

El marcaje *in vivo* de células recién sintetizadas reflejó una mayor tasa de replicación de las células  $\beta$  en páncreas de los animales transgénicos respecto a los animales control (Fig. 25). Este incremento se observaba tanto en animales transgénicos sanos como a los 8 días tras el tratamiento con Stz, permaneciendo elevado incluso 3 meses después (Fig. 25). También se observó marcaje en células epiteliales de los conductos pancreáticos y ocasionalmente en células exocrinas (datos no mostrados). Por tanto, estos resultados indicaban que el IGF-I producido por las células  $\beta$  preexistentes estimulaba la tasa de replicación de las células  $\beta$  en el páncreas de estos animales transgénicos.

**Figura 24. Análisis triple inmunohistoquímico (Glucagón + Somatostatina + polipéptido pancreático)/Insulina/BrdU en secciones de páncreas a distintos tiempos tras el tratamiento con Stz. A) Islote de animal transgénico. B) Islote de animal control. Las flechas indican los núcleos que se están replicando.(X1000)**

**Figura 25. Análisis de la tasa de replicación.** Se realizó un análisis triple inmunohistoquímico (Glucagón + Somatostatina + polipéptido pancreático)/Insulina/BrdU en secciones de páncreas de los ratones controles y transgénicos a distintos tiempos del tratamiento con Stz. Se analizaron 4 secciones de páncreas por animal separadas 50  $\mu\text{m}$  entre sí. Se analizaron 3 animales controles y tres animales transgénicos para cada tiempo indicado.

Este estudio indica que la síntesis y acción local de IGF-I en las células  $\beta$ , bajo condiciones de destrucción de estas células, estimula la neogénesis y replicación de dichas células. Estos procesos resultaron suficientemente eficientes en los ratones transgénicos como para restablecer la normoinsulinemia y, por tanto, la normoglucemia en los animales sometidos al tratamiento con Stz.

Los animales transgénicos que expresaban IGF-I en células  $\beta$  pancreáticas mostraban una tasa de replicación del orden de 2-3 veces más elevada que sus análogos control. Así, nuestros resultados se correspondían con la inducción de la proliferación de células  $\beta$  observada en la línea de células pancreáticas Ins-1, donde la estimulación de IGF-I era dependiente de glucosa y provocaba un incremento en la tasa de replicación (Hügl, S y col, 1998). También, nuestros resultados están de acuerdo con observaciones *in vivo* que indican que la señalización a través del receptor de IGF-I promueve el desarrollo y la proliferación de la célula  $\beta$  (Withers y col, 1999). Por otra parte, dado que se ha observado que las células  $\beta$  de islotes presentan receptores para IGF-I (Van Schravendijk, 1987) y que ratones que carecen de receptores para IGF-I y para IRS-2 (insulin receptor substrate 2) sufren una marcada disminución de masa de células  $\beta$  y mueren de diabetes, ello parece indicar que los receptores de IGF-I se acoplan al IRS-2 en la célula  $\beta$ , mediando el desarrollo, proliferación y supervivencia de células  $\beta$ . Recientemente, se observó que la expresión de HGF (*hepatocyte growth factor*) en célula  $\beta$  de ratones transgénicos, conllevan a un incremento en la tasa de replicación dando como resultado un aumento de la masa de célula  $\beta$  de 2-3 veces respecto al valor normal (García-Ocaña A, 2000). También IGF-II sobreexpresado en células  $\beta$  de ratones transgénicos da lugar a un incremento en la masa de células  $\beta$  (Devedjian JC y col, 2000)

Por otra parte, el marcado incremento observado en la tasa de neogénesis de nuestros animales transgénicos (7 veces el valor control) está de acuerdo con unos estudios realizados en ratas (Smith, 1991) y perros (Hayakawa H y col, 1996) a los que se les había sometido a una pancreatectomía parcial. En estos modelos animales se observó un incremento en la expresión y síntesis de IGF-I, en los páncreas residuales en proceso de regeneración, sugiriendo que IGF-I podía estar involucrado en la diferenciación y crecimiento de tejido endocrino pancreático. También en pacientes

diabéticos de reciente aparición, se ha descrito neogénesis de células  $\beta$  a partir de células de conductos (Gepts, 1978).

El tratamiento con Stz induce insulinitis y su grado de afectación depende de la cepa de ratón utilizada (Rossini A y col, 1977). La inyección de múltiples dosis de Stz conlleva a la expresión de citoquinas en los islotes (Huang X y col, 1994) y la muerte de células  $\beta$  por apoptosis (O' Brien B y col, 1996). Además, el tratamiento con STZ induce la formación de radicales libres y óxido nítrico (NO) en el islote (Turk J y col, 1993), directamente involucrados en la destrucción de la célula  $\beta$ . En este estudio, se observó que la producción local de IGF-I protegió las células  $\beta$  de los efectos oxidativos y apoptóticos de la STZ y limitó el alcance de la insulinitis. Estos resultados concuerdan con el papel protector de IGF-I contra la muerte celular mediada por citoquinas *in vitro* (Mabley J y col, 1997). Además, IGF-I es capaz de bloquear la actividad óxido nítrico sintasa (iNOS) *in vitro* (Castrillo A y col, 2000). También están de acuerdo con el hallazgo de que la vía receptor-IGF-I / IRS-2 protege a las células  $\beta$  frente a apoptosis *in vivo* (Withers DJ y col, 1999). Puede que también en nuestros animales, IGF-I estuviese actuando a través de la inhibición de la óxido nítrico sintasa (iNOS) *in vivo* ya que se ha observado que ratones "knock-out" para la enzima iNOS, estaban protegidos contra la destrucción de células  $\beta$  inducida por el tratamiento de múltiples dosis de Stz (Flodström M y col, 1999). Por otra parte, la administración subcutánea de rhIGF-I en los ratones NOD antes de la aparición de la diabetes, reduce la incidencia de diabetes y de insulinitis, pero no una vez ya iniciada la enfermedad (Bergerot I y col, 1995).

La desorganización de los islotes también se detectó en animales transgénicos que expresan IGF-II en células  $\beta$  (Devedjian JC y col, 2000) y en ratones que carecen de los genes del receptor de insulina y de IRS-1 (Bruning JC y col, 1997), sugiriendo que un incremento en la respuesta mediada por el receptor de IGF-I estaría involucrada en esta alteración. A pesar de ello, no se observó una proliferación incontrolada de células  $\beta$  en el islote en los ratones transgénicos, probablemente debido a la expresión regulada de IGF-I por el promotor RIP-I. Esta hipótesis estaría de acuerdo con el presumible papel de la insulina en el control de la masa de células  $\beta$ . Modelos de ratón



que carecen de los genes de insulina-1 y -2, muestran hiperplasia de islotes y proliferación anormal de células  $\beta$  no funcionales (Duvillie B y col, 1997). Así pues, muy probablemente cabría esperar una cooperación entre la insulina y el IGF-I de manera tal que la masa de células  $\beta$  en estos transgénicos se mantenga en equilibrio.

Por otra parte, la expresión de IGF-I no afectó otros órganos, a juzgar por la similitud observada en cuanto a los niveles de glucosa, IGF-I e insulina circulantes, y peso corporal entre ratones controles y transgénicos sanos. Estas observaciones están de acuerdo con la acción autocrina/paracrina del IGF-I en este modelo transgénico. Por otra parte, se ha podido observar en ratones “knock-out” de IGF-I específico de hígado, que el IGF-I no es un factor crítico en el desarrollo y crecimiento de estos animales (Yakar S y col, 1999), ya que a pesar de que el hígado es el principal productor de IGF-I circulante, estos animales presentan un desarrollo normal.

Así pues, la síntesis de IGF-I en células  $\beta$ , estimuló la recuperación de la masa de células  $\beta$  a través de los tres mecanismos responsables del mantenimiento de la masa de células  $\beta$  en la vida adulta. Estos mecanismos son por una parte, un incremento de la neogénesis a partir de células de conductos, y por otra, la replicación a partir de células  $\beta$  preexistentes. Por último, el IGF-I disminuyó la apoptosis, que en individuos sanos es responsable de mantener el equilibrio de la masa celular y en individuos diabéticos está considerado como el mecanismo principal de muerte celular durante el desarrollo de la enfermedad. Por tanto, la transferencia del gen del IGF-I a páncreas endocrino podría representar una aproximación de terapia génica de la diabetes tipo 1. Estudios futuros en nuestro laboratorio abordarían el desarrollo de protocolos de transferencia de IGF-I *in vivo* a animales diabéticos.

## **V. CONCLUSIONES**

1- Ratones transgénicos (de background genético C57Bl6/SJL) que sobreexpresan IGF-I en células  $\beta$ , tratados con estreptozotocina (Stz), desarrollan una hiperglucemia suave, pero gradualmente normalizan la glucemia y sobreviven normalmente. En cambio, los ratones control tratados con Stz desarrollan diabetes abierta y no sobreviven más de cuatro meses.

2- En los ratones transgénicos se compensa la destrucción de las células  $\beta$  provocada por el tratamiento con Stz gracias a un incremento de la masa total de célula  $\beta$  y de la tasa de célula  $\beta$  neogénica.

3- Mediante cuatro retrocruzamientos de animales transgénicos de la cepa C57Bl6/SJL con animales de la cepa CD-1, se han obtenido ratones transgénicos que sobreexpresan IGF-1 en las células  $\beta$  en background genético CD-1.

4- Los ratones controles y transgénicos de background CD-1 desarrollan insulinitis tras un tratamiento con bajas dosis de Stz. Sin embargo, la producción local de IGF-1 en los ratones transgénicos protege parcialmente a la célula  $\beta$  de los efectos apoptóticos de la Stz y disminuye la infiltración linfocitaria de los islotes.

5- Los ratones transgénicos desarrollan una severa hiperglucemia, hipoinsulinemia, polidipsia y polifagia tras la inducción de diabetes experimental, pero gradualmente normalizan todos los parámetros metabólicos y sobreviven más allá de los 8 meses.

6- Tras tres meses de tratamiento con Stz, los ratones transgénicos muestran un test de tolerancia a la glucosa normal, indicando que responden correctamente a una sobrecarga del azúcar.

7- La normalización de los parámetros metabólicos en los animales transgénicos tratados con Stz es paralela a un incremento de la masa de célula  $\beta$ , como resultado de un aumento en la tasa de replicación y en la tasa de neogénesis de las mismas.

8- Todos estos resultados indican que la producción local de IGF-1 en las células  $\beta$  puede contrarrestar la diabetes tipo 1.

9- Este trabajo sugiere que la transferencia del gen del IGF-1 al páncreas podría constituir una terapia adecuada para regenerar el páncreas endocrino y así revertir la diabetes tipo 1.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **1. MATERIALES.**

### **1.1. Animales.**

Los animales empleados proceden del cruce de las cepas C57BL/6 y SJL (Jackson Laboratories) y portan el gen quimérico RIP-I/IGF-I. Han sido previamente obtenidos y caracterizados (Cristina Costa Valles, Tesis Doctotal. 1995. UAB). Posteriormente se retrocruzaron con CD1 hasta llegar la generación N4. Los animales se utilizaron de acuerdo con la legislación vigente y con la aprobación del Comité de Ética y de Experimentación Animal y Humana de la UAB.

### **1.2 Reactivos.**

Todos los reactivos de biología molecular se adquirieron de las firmas comerciales Roche, Gibco-BRL y Pharmacia. Los productos marcados radioactivamente [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP se adquirió en Amersham. La estreptozotocina utilizada para inducir diabetes experimental se adquirió en Sigma.

### **1.3 Sondas.**

La sonda IGF-1 utilizada tanto para el Southern blot como para el Northern blot, correspondía al fragmento *EcoRI/EcoRI* de 0.8 Kb del cDNA de IGF-1 de ratón. La sonda de insulina utilizada para el Northern blot, correspondía al fragmento *SmaI/XhoI* de 0.36 Kb del cDNA de la insulina humana (cedido por el Dr.W.Rutter).

### **1.4 Anticuerpos.**

El anticuerpo de conejo contra IGF-1 de rata se obtuvo en GroPep, Adelaide, Australia. El anticuerpo de cobayo contra insulina porcina en DAKO Corp., Carpinteria, CA. Los anticuerpos de conejo contra glucagón humano, somatostatina humana y polipéptido pancreático humano de ICN Biomedicals Inc.,Cleveland, OH.

## **2. MÉTODOS.**

## **2.1. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE DNA.**

### **2.1.1. Obtención de DNA genómico.**

Para la extracción de DNA genómico empleado en la detección de los animales transgénicos mediante Southern blot, se siguió el método de De Wet y col. (1987) a partir de cola de ratón. Este método consiste en la obtención de DNA de un homogenado de cola de ratón en una solución tamponada que contiene proteinasa K y SDS, incubación a 55°C y purificación por extracción con fenol y fenol-cloroformo. Posteriormente, es precipitado con isopropanol y resuspendido en TE.

Soluciones empleadas en el protocolo:

#### Tampón de lisis (preparación extemporánea)

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

#### TE

Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1 mM

### **2.1.2. Análisis de los animales por PCR.**

La detección de los animales transgénicos se realizó mediante la técnica de PCR en la que se utilizaron dos *primers* específicos para el transgén. El primero (P1) estaba situado en el primer exón del gen de la insulina de rata y el segundo (P2) se localizaba en el cDNA de  $\beta$ -globina. De esta manera, sólo se amplifica la banda en aquellos animales que presentan el gen quimérico en su genoma.

#### Primers utilizados

P1 : 5' CCC TCT CGC CAT CTG CCT ACC TAC C 3' (RIP-I 5')

P2 : 5' AAG AGA AAG GCA GGA TGA TGA CCA G 3' ( $\beta$ -Globin 3')

La amplificación del DNA obtenido a partir de un fragmento de cola se realizó en un termociclador Perkin-Elmer 9600 siguiendo las indicaciones del proveedor.

Condiciones de la PCR

94°C 30 seg.

68°C 60 seg.

Nº de ciclos : 30

## **2.2. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE RNA.**

### **2.2.1. Preparación de RNA total.**

La preparación de RNA a partir de tejidos animales ricos en ribonucleasas, consta en un primer paso en el cual el tejido congelado en nitrógeno líquido y homogenizado hasta polvo fino es descongelado en un tampón conteniendo tiocianato de guanidinio y otros agentes desnaturizantes con el fin de inactivar las RNAsas. Le sigue una purificación mediante centrifugación en gradiente en CsCl y una posterior precipitación con etanol. En el caso de tejido pancreático empleamos preferentemente el tejido en fresco por obtenerse un RNA de mayor calidad.

Cuando el material de partida era cultivo celular, se añadió la solución desnaturizante directamente a la placa previa eliminación del medio de cultivo.

### **2.2.2. Electroforesis del RNA en geles desnaturizantes de agarosa/formaldehído.**

Este tipo de geles eran utilizados para el fraccionamiento del RNA en experimentos de "Northern blot", ya que el formaldehído a concentración 2,2 M actúa desnaturizando las estructuras secundarias del RNA. Este hecho permite que la migración del RNA sea proporcional al logaritmo de su peso molecular y posibilita el cálculo del tamaño molecular de los diferentes mensajeros específicos. Los tampones de electroforesis y de carga, que se describen a continuación, debían ser preparados en



condiciones libres de contaminación con ribonucleasas para evitar la degradación enzimática del RNA.

Tampón borato 10x pH=7.0

Borato sódico	62 mM
Acido bórico	620 mM
Citrato sódico	12 mM

Tampón de electroforesis

Tampón Borato 1 x
Formaldehído 3,7% (vol/vol)

Tampón de carga para RNA 3x

Metilmercurio	4.5% (vol/vol)
Glicerol	30% (vol/vol)
Azul de bromofenol	0.5% (p/vol)
SDS	1.5% (p/vol)
Tampón borato	0.5x

**2.2.3. Análisis de RNA por "Northern Blot" (hibridación DNA-RNA).**

Esta técnica consiste en la hibridación de una sonda de DNA o RNA marcada radioactivamente con RNA fraccionado en un gel desnaturizante de agarosa y fijado a un filtro de nylon o nitrocelulosa.

La transferencia de RNA a la membrana es básicamente similar a la descrita para el caso de "Southern blot", con la excepción de que el RNA no es nunca depurinado o desnaturizado con NaOH. En nuestro caso, las transferencias se realizaron empleando presión positiva mediante Posiblot (Stratagene, La Jolla, CA). Una vez finalizadas éstas, el filtro era irradiado con luz ultravioleta de onda corta para crear uniones covalentes del RNA con el nylon mediante el uso de UV-Stratalinker modelo 1800 (Stratagene, La Jolla, CA). El tamaño molecular de la banda de hibridación se calculaba mediante interpolación sobre una recta patrón realizada mediante marcadores de tamaño molecular de RNA fraccionados en el mismo gel y que posteriormente se habían teñido con bromuro de etidio.

El protocolo para la prehibridación, hibridación y lavados era el recomendado por la firma fabricante de las membranas de nylon, GeneScreen*PLUS* (NEN, Boston, MA), destacando la presencia de formamida desionizada en las soluciones de prehibridación e hibridación con objeto de incubar los filtros a una baja temperatura (42 °C), ya que el RNA no puede ser calentado a altas temperaturas durante tiempo prolongado

Solución de prehibridación e hibridación

Formamida desionizada	50% (vol/vol)
NaHPO <sub>4</sub> pH 7	250 mM
NaCl	50 mM
EDTA	1 mM
BLOTTO	0,1% (p/vol)
SDS	1% (p/vol)
DNA desnaturalizado de salmón	0.5 mg/mL

**2.2.4. Marcaje radioactivo de sondas.**

Como método de elección para el marcaje de sondas usadas en los "Northern blot" se empleó el preparado comercial "Random primed DNA Labeling Kit", (Roche, Alemania), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las sondas marcadas radioactivamente eran obtenidas incubando de 10 a 50 ng de sonda a 37 °C durante 1 h. con una mezcla de dATP, dGTP, dTTP y [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP en presencia del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Esta técnica (Feinberg y Vogelstein, 1983), permite la síntesis de sondas de DNA de alta radioactividad específica ( $1,8 \times 10^9$  dpm/mg) y marcadas uniformemente. La separación de los nucleótidos no incorporados se conseguía mediante gel filtración en columnas de Sephadex G-50.

**2.3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS SÉRICOS.**

Para la obtención del suero se sacrificó a los animales por decapitación e inmediatamente se recogió la sangre en tubos de vidrio mantenidos a 0 °C. El suero se obtuvo tras dejar coagular la sangre durante 30 minutos a 0 °C. El coágulo se separó

mediante centrifugación a 2000xg durante 15 minutos. El suero se mantenía congelado a - 20 °C hasta el momento de la determinación de la insulina o IGF-1.

### **2.3.1. Glucosa.**

Los niveles de glucosa en sangre se determinaron mediante el sistema Glucometer elite™ de Bayer a partir de 5µl de sangre total obtenida de la vena caudal de los animales.

### **2.3.2. Insulina.**

La insulina se determinó por radioinmunoensayo en suero y en medios de incubación de islotes aislados (CIS Biointernational, Gif-Sur-Yvette, Francia). El método tiene un límite de sensibilidad de 30 pM y una variación intraensayo del 6%.

### **2.3.3. IGF-1.**

Los niveles de IGF-1 en suero se determinaron por radioinmunoensayo (Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA, USA).

### **2.3.4. Triglicéridos.**

Los triglicéridos séricos se determinaron siguiendo el método enzimático de Wahlefeld (1974) basado en la cuantificación del cromógeno PAP. Este es obtenido a partir de tres reacciones acopladas en las que intervienen la glicerol quinasa, la glicerol 3-fosfato oxidasa y la peroxidasa. Se empleó el ensayo Peridochrom<sup>R</sup> Triglicéridos GPO-PAP, adaptado por Roche para el COBAS-bio.

### **2.3.5. Ácidos grasos no esterificados (NEFAs).**

La determinación de los ácidos grasos no esterificados en suero se realizó mediante el método enzimático NEFA C de la firma comercial Wako Chemicals, Neuss, Alemania, adaptado al autoanalizador COBAS-bio. Se basaba en la cuantificación de un

cromógeno obtenido tras el acoplamiento de tres reacciones en las que intervienen la Acil-CoA sintetasa, la Acil-CoA oxidasa y la peroxidasa.

### **2.3.6 $\beta$ -Hidroxibutirato.**

Los niveles séricos de  $\beta$ -hidroxibutirato se determinaron en el autoanalizador COBAS BIO, utilizando el método colorimétrico del kit comercial D-3-Hydroxybutyric acid de Roche.

## **2.4. TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA.**

El test de tolerancia a la glucosa es un test que tiene como objetivo comprobar si los animales son capaces de responder correctamente a una sobrecarga de glucosa. Se escogieron animales controles y transgénicos y fueron anestesiados con Avertin. Se les realizó un control de la glucemia basal a tiempo cero. La glucemia fue medida con el Glucometer Elite <sup>TM</sup> de Bayer. Cuando los animales se estabilizaron se les inyectó intraperitonealmente una dosis de 1 mg de glucosa por gramo de peso vivo. A partir de este momento se realizaron extracciones de sangre seriadas con un intervalo de 30 min hasta las 3 horas desde el inicio del test.

## **2.5. INDUCCIÓN DE LA DIABETES EXPERIMENTAL MEDIANTE STZ.**

Se administraron 5 dosis STZ consecutivas durante 5 días por vía intraperitoneal, de 50mg/Kg de peso corporal. La estreptozotocina se disolvió en una solución de citrato sódico 10 mM con 0.9 % NaCl, pH 4,5 inmediatamente antes de su administración.

## **2.6. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO.**

Para la detección inmunohistoquímica de IGF1, insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático, los páncreas procedentes de ratones transgénicos y controles se fijaron durante 12-14 h en formol, posteriormente se incluyeron en parafina con un inclusor tipo Histokinette y de aquí se realizaron diferentes secciones. Las secciones eran incubadas durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos: contra IGF1 (GroPep, Adelaide, Australia) dilución 1:100, contra insulina

(DAKO Corp., Carpinteria, CA) dilución 1:1000, contra glucagón (ICN Biochemicals Inc., Cleveland, OH) dilución 1:4000, contra somatostatina (ICN Biochemicals Inc., Cleveland.) dilución 1:2000, contra polipéptido pancreático (ICN Biochemicals Inc.) dilución 1:20000. El anticuerpo secundario IgG de conejo contra cobayo, conjugado con peroxidasa era de Roche Molecular Biochemicals, el secundario de cabra contra conejo biotinilado y como terciario el conjugado con el complejo ABC obtenido en Vector, Burlingame, CA. Como cromógeno se usó diaminobenzidina (DAB). Los cortes se contrastaban con Mayer's hematoxilina.

### **2.6.1 Análisis de los niveles de replicación de la célula $\beta$ .**

Para medir los niveles de replicación se inyectaban intraperitonealmente 100mg/Kg de peso de 5-bromo-2-deoxyuridina (BrdU) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), a ratones control y transgénicos 8 horas antes de su sacrificio. En secciones de parafina (5 $\mu$ m) se realizaba doble tinción para ver las células no  $\beta$ , con un cóctel de anticuerpos contra (glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático), y para la BrdU (bromodeoxyuridina), con un anticuerpo monoclonal de ratón contra BrdU (Sigma Chemical Co.) diluido 1:1000, seguidamente se añadió un segundo anticuerpo contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa. En estos cortes se observaban con el citosol rojo las células no  $\beta$ , mientras que las células positivas para BrdU tenían el núcleo marrón oscuro. Seguidamente se contaban el número de células  $\beta$  positivas por corte. Los datos se expresaban como porcentaje de células  $\beta$  BrdU positivas por el número total de células  $\beta$ , tras 8h de la inyección de BrdU.

### **2.6.2 Análisis morfométrico.**

Para el análisis morfométrico, los páncreas se obtenían de animales controles y transgénicos, y la detección inmunohistoquímica de insulina se realizaba en 3 secciones (2 a 3  $\mu$ m) separadas cada una por unos 200  $\mu$ m. El área de los islotes y el área de cada sección de páncreas se determinaba utilizando el microscopio Nikon Eclipse E800 (Nikon Corp., Tokio, Japan) conectado a una cámara de video con un monitor en color y un analizador de imágenes (analySIS 3.0, Soft Imaging System Corp., Lakewood, CO). Mediante la inmunodetección de insulina se delimitaba el área de células  $\beta$  del páncreas. El porcentaje de célula  $\beta$  del páncreas se calculaba dividiendo el sumatorio de las áreas

que presentaban positividad a insulina en una sección de páncreas por el área total de la sección y multiplicando esta relación por 100. La masa de célula  $\beta$  se calculaba multiplicando el peso del páncreas por el % del área de célula  $\beta$ . La neogénesis era determinada de forma similar, pero solo se contaban las células positivas para insulina adheridas a los ductos pancreáticos por sección. Para determinar el tamaño de la célula  $\beta$ , se hacía la media del área de las secciones de todas las células individuales adheridas a los ductos. Para obtener el porcentaje del área de células  $\beta$  neogénicas en cada sección, se multiplicaba el número de células  $\beta$  adheridas a los ductos por el tamaño de la célula  $\beta$  y se dividía por el área total de la sección y esta relación era multiplicada por 100. La masa de célula  $\beta$  neogénica se obtenía multiplicando el peso del páncreas por el % del área de célula  $\beta$  neogénica.

### **2.6.3 Detección de apoptosis en la célula $\beta$ .**

Para el análisis de la apoptosis se desparafinaban las muestras con xilol y etanol (100%,96% diluido con agua destilada). Seguidamente se trataban las muestras con Proteinasa K (20 $\mu$ g/ml con Tris/HCl pH 7.6, 5-10min, 37°C). Posteriormente se permeabilizaban las muestras con Triton X (0.1% en PBS, 2 min a 25°C). Finalmente se realizaba doble tinción para detectar apoptosis y célula  $\beta$ , utilizando marcaje terminal con dideoxynucleotidos dUTP mediada por dideoxinucleotiltransferasa (TdT), Kit de Detección de muerte celular *In Situ*, ( Roche ) y anticuerpo de cobaya contra insulina porcina (1:1000). Como secundario para la insulina se usó un anticuerpo de conejo contra cobaya marcado con rodamina (Sigma Chemical Co.). Además se contrastaban las muestras con Hoechst (33258), para descartar falsos positivos y asegurar que eran núcleos y no eritrocitos. Una vez realizada la inmuno se contaban el número de células doble positivas para TUNEL y insulina por sección. Los resultados se expresaban como porcentaje de células doble positivas por el total de células  $\beta$ .

### **2.6.4 Análisis del grado de insulinitis.**

Para determinar el grado de infiltración de los islotes las secciones de páncreas se contrastaban con hematoxilina/eosina. Posteriormente se contaban el número de islotes no infiltrados, **0**: con una infiltración <25%, **1**: con una infiltración >25% y <50%, **2**: y con un grado de infiltración >50%, **3** por corte. Se contaron

aproximadamente 25 islotes por corte y 12 cortes por animal. Los datos se expresan como el porcentaje del grado de infiltración por el total de islotes.

## **2.7. CÁLCULO ESTADÍSTICO.**

Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estandar de la media. La comparación de resultados se realiza mediante t de Student de datos no apareados. Las diferencias se consideran estadísticamente significativas con \*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$ .

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



Adams TE, Alpert S, Hanahan D. (1987). Non-tolerance and autoantibodies to a transgenic self antigen expressed in pancreatic beta cells. *Nature*. **325**:223-8.

Ankarcrona M, Dypbukt JM, Brune B, Nicotera P. (1994) Interleukin-1 beta-induced nitric oxide production activates apoptosis in pancreatic RINm5F cells. *Exp Cell Res*. **213**:172-7.

Baillyes EM, Shennan KIJ, Seal A.J, Smeekens, S.P., Steiner, D.F., Hutton, J.C. y Docherty, K. (1992) A member of the eukaryotic subtilisin family (PC3) has the enzymic properties of the type 1 proinsulin-converting endopeptidase. *Biochem. J*. **285**

Baroni MG, Cavallo MG, Mark M, Monetini L, Stoehrer B, Pozzilli P. (1999). Beta-cell gene expression and functional characterisation of the human insulinoma cell line CM. *J Endocrinol*. **161**:59-68.

Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*. **75**:73-82.

Beattie GM, Lopez AD, Otonkoski T, Hayek A. (1999). Transplantation of human fetal pancreas: fresh vs. cultured fetal islets or ICCS. *J Mol Med* **77**:70-3.

Bennett DL, Baillyes EM, Nielsen E, Guest PC, Rutherford NG, Ardden SD, y Hutton JC. (1992) Identification of the type 2 proinsulin processing endopeptidase as PC2, a member of the eukaryote subtilisin family. *J. Biol. Chem*. **267**, 15229-15236

Bergerot I, Fabien N, Maguer V, Thivolet C. (1995). Insulin-like growth factor I (IGF-I) protects NOD mice from insulinitis and diabetes. *Clin. Exp. Immunol*. **102**:335-340.

Binder C, Lauritzen T, Faber O, and Pramming, S. (1984). Insulin pharmacokinetics. *Diabetes Care*. **7**:188-199.

Blundell TL, Bedarkar S, Rinderknecht E, Humbel RE. (1978). Insulin-like growth factor: a model for tertiary structure accounting for immunoreactivity and receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **75**:180-4.

Blundell TL, Bedarkar S, Humbel RE. (1983). Tertiary structures, receptor binding, and antigenicity of insulinlike growth factors. *Fed Proc.* **42**:2592-7.

Bonner-Weir S, Deery D, Leahy JL, Weir GC. (1989). Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion. *Diabetes.* **38**:49-53.

Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, and Smith FE (1993). A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* **42**:1715-1720.

Bonner-Weir, S., Scaglia, L., Montana, E., Juang, J.H. and Weir, G.C. (1995). *Diabetes 1994* (eds. S. Baba and T. Kareko) 179-228 (Exerta Medica Int. Congress).

Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, Friesen HG, Sorenson RL. (1993) Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy *Endocrinology.* **132**:879-87.

Bretherton-Watt D, Gore N, Boam DSW. (1996). Insulin upstream factor 1 and a novel ubiquitous factor bind to the human islet amyloid polypeptide amylin gene promoter. *Biochem J* **313**: 495-502.

Bruning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR..(1997). Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell* **21**:561-572.

Buzzetti R, Quattrocchi CC, Nistico L. (1998). Dissecting the genetics of type 1 diabetes: relevance for familial clustering and differences in incidence. *Diabetes Metab Rev.* **14**:111-28.

Cain K, Bratton SB, Langlais C, Walker G, Brown DG, Sun XM, Cohen GM. (2000). Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem.* **275**:6067-70.

Cantenys D, Portha B, Dutrillaux MC, Hollande E, Rozé C, Picon L.(1981) Histogénesis of the endocrine pancreas in newborn rats after destruction by streptozotocin. *Virchows Arch* **35**:109-122.

Castrillo, A., Bodelón, O.G., and Boscá, L. (2000). Inhibitory effect of IGF-I on Type 2 nitric oxide synthase expression in Ins-1 cells and protection against activation-dependent apoptosis: Involvement of Phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetes* **49**:209-217.

Cetkovic-Cvrlje M, Gerling IC, Muir A, Atkinson MA, Elliot JF, Leiter EH. (1997). Retardation or acceleration of diabetes in NOD/Lt mice mediated by intrathymic administration of candidate beta-cell antigens. *Diabetes*. **46**:1975-82.

Charlton B, Taylor-Edwards C, Tisch R, Fathman CG. (1994). Prevention of diabetes and insulinitis by neonatal intrathymic islet administration in NOD mice. *J Autoimmun*. **7**:549-60.

Clark SA., Quaade C, Constandy H, Hansen P, Halban P, Ferber S, Newgard CB, and Normington K. (1997). Novel insulinoma cell line produced by iterative engineering of GLUT2, glucokinase, and human insulin expression. *Diabetes*, **46**:958-967.

Cretin N, Buhler L, Fournier B, Caulfield A, Oberholzer J, Mentha G, Morel P. (1998) Human islet allotransplantation: world experience and current status. *Dig Surg*. **15**:656-62.

Czech MP, Yu KT, Seals JR. (1984). Cellular signaling by the insulin receptor. *Diabetes Care*. **7**:8-16.

Dafgard E, Bajaj M, Honegger AM, Pitts J, Wood S, Blundell T. (1985).The conformation of insulin-like growth factors: relationships with insulins. *J Cell Sci* **3**:53-64.

Dandoy-Dron F, Monthieux E, Jami J, Bucchini D. (1991) Regulatory regions of rat insulin I gene necessary for expression in transgenic mice. *Nucleic Acids Res.* **19**:4925-30.

Daughaday WH, 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.

Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, Reed PW, Gough SC, Jenkins SC, Palmer SM. (1994). A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature.* **371**:130-6.

DeFronzo RA (1997) Pathogenesis of type 2 diabetes, metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diab Rev.* **5**, 177-269

Devedjian JC, Pujol A, Cayla C, George M, Casellas A, Paris H, Bosch F.(2000). Transgenic mice overexpressing  $\alpha_{2A}$ -adrenoreceptors in pancreatic beta-cells show altered regulation of glucose homeostasis. *Diabetologia* **43**: 899-906.

Devedjian JC, George M, Caselles A, Pujol A, Visa J, Pelegrin M, Gros L, Bosch F. (2000). Transgenic mice overexpressing Insulin-like Growth factor II in  $\beta$  cells develop type 2 diabetes. *J Clin. Invest.* **105**:731-40.

Dobersen MJ, Scharff JE, Ginsberg-Fellner F, Notkins AL. (1980). Cytotoxic autoantibodies to beta cells in the serum of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* **303**:1493-8.

Docherty K, Clark AR. (1994). Nutrient regulation of insulin gene expression. *FASEB J.* **8**:20-27.

Dunger A, Augstein P, Schmidt S, Fisher U. (1996). Identification of interleukin-1- beta induce apoptosis in rat islets using in situ specific labelling of fragmented DNA. *J autoimmun* **9**:309-313.

Duvillie B, Cordonnier N, Deltour L, Dandoy-Dron F, Itier JM, Monthieux E, Jami J, Joshi RL, Bucchini D. (1997). Phenotypic alterations in insulin-deficient mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:5137-5140.

Edlund T, Walker MD, Barr PJ, Rutter WJ. (1985). Cell-specific expression of the rat insulin gene: evidence for role of two distinct 5' flanking elements. *Science*. **230**:912-6.

Efrat S. (1996). Genetic engineering of  $\beta$ -cells for cell therapy of diabetes: cell growth, function, and immunogenicity. *Diab. Rev.* **4**:224-234.

Efrat, S. (1998). Prospects for gene therapy of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* **41**:1401-1409.

Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol.***20**:929-35

Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, Barshack I, Seiffers R, Kopolovic J, Kaiser N, Karasik A.(2000) Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med.* **6**:568-72.

Ferre T, Riu E, Bosch F, Valera A. (1996). Evidence from transgenic mice that glucokinase is rate limiting for glucose utilization in the liver. *FASEB J.* **10**:1213-8.

Ferre T, Pujol A, Riu E, Bosch F, Valera A. (1996) Correction of diabetic alterations by glucokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:7225-30.

Flier JS, Usher P, Moses AC. (1986). Monoclonal antibody to the type I insulin-like growth factor (IGF-I) receptor blocks IGF-I receptor-mediated DNA synthesis: clarification of the mitogenic mechanisms of IGF-I and insulin in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83**:664-8.

Flodström M, Tyrberg B, Eizirik DL, Sandler S. (1999). Reduced sensitivity of inducible nitric oxide synthase-deficient mice to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* **48**: 706-713.

French MB, Allison J, Cram DS, Thomas HE, Dempsey-Collier M, Silva A, Georgiou HM, Kay TW, Harrison LC, Lew AM. (1997). Transgenic expression of mouse proinsulin II prevents diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes* **46**, 34-39.

Garcia-Ocaña A, Takane KK, Syed MA, Philbrick WM., Vasavada RC, 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.

Gepts W. (1965). Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*. **14**:619-33.

Gepts W, De Mey J (1978) Islet cell survival determined by morphology. An immunocytochemical study of the islet of Langerhans in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* **27**: 251-261

German M, Ashcroft S, Docherty K, Edlund H, Edlund T, Goodison S, Imura H, Kennedy G, Madsen O, Melloul D, et al. (1995). The insulin gene promoter. A simplified nomenclature. *Diabetes*. **44**:1002-4.

Ghivizzani SC, Lechman ER, Kang R, Tio C, Kolls J, Evans CH, Robbins PD. (1998) Direct adenovirus-mediated gene transfer of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha soluble receptors to rabbit knees with experimental arthritis has local and distal anti-arthritic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**:4613-8.

Giannoukakis N, Rudert WA, Trucco M, Robbins PD. (2000) Protection of human islets from the effects of interleukin-1beta by adenoviral gene transfer of an IkappaB repressor. *J Biol Chem*. Aug 30

Giannoukakis N, Rudert WA, Ghivizzani SC, Gambotto A, Ricordi C, Trucco M, Robbins PD. (1999) Adenoviral gene transfer of the interleukin-1 receptor antagonist protein to human islets prevents IL-1beta-induced beta-cell impairment and activation of islet cell apoptosis in vitro. *Diabetes*. **48**:1730-6.

Gros L, Riu E, Montoliu L, Ontiveros M, Lebrigand L, Bosch F. (1999). Insulin production by engineered muscle cells. *Hum Gene Ther*. **10**:1207-17.

Gros L, Montoliu L, Riu E, Lebrigand L, y Bosch, F. (1997). Regulated production of insulin by non- $\beta$ -cells. *Hum. Gene Ther*. **8**: 2249-2259.

Gu D, Arnush M, Sawyer SP, Sarvetnick N. (1995). Transgenic mice expressing IFN-gamma in pancreatic beta-cells are resistant to streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol*. **269**:E1089-94.

Guler HP, *et al* (1989). Effects of recombinant insulin-like growth factor I on insulin secretion and renal function in normal human subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**:2868-2872.

Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne VL, Culhane AC, Williams GT. (1996). Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem*. **236**:1-26.

Hanahan D. (1985). Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature*. **315**:115-22.

Harrison M, Dunger AM, Berg S, Mabley J, John N, Green MH, Green IC. (1998). Growth factor protection against cytokine-induced apoptosis in neonatal rat islets of Langerhans: role of Fas. *FEBS Lett*. **435**:207-10.

Hayakawa H, Kawarada Y, Mizumoto R, Hibasami H, Tanaka M, Nakashima K. (1996). Induction and involvement of endogenous IGF-I in pancreas regeneration after partial pancreatectomy in the dog. *J. Endocrinol*. **149**:259-267.

Heine RJ, Bilo HJK, and Sikenk AC. (1985). Mixing short and intermediate acting insulins in the syringe: effects on the postprandial blood glucose concentrations in type I diabetics. *Bio. Med. J.* **290**: 204-205.

Hellerstrom C, Andersson A, Groth CG, Sandler S, Jansson L, Korsgren O, Swenne I, Petersson B, Tollemar J, Tyden G. (1988) Experimental pancreatic transplantation in diabetes. *Diabetes Care.* **11**:45-53.

Herrera PL, Harlan DM, Vassalli P. (2000). A mouse CD8 T cell-mediated acute autoimmune diabetes independent of the perforin and Fas cytotoxic pathways: possible role of membrane TNF. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**:279-84.

Hintz RL, Clemmons DR, Underwood LE, Van Wyk JJ. (1972). Competitive binding of somatomedin to the insulin receptors of adipocytes, chondrocytes, and liver membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **69**:2351-3.

Hohmeier HE, Beltrandelrio H, Clark SA, Henkel-Rieger R, Normington K, and Newgard, C.B. (1997). Regulation of insulin secretion from novel engineered insulinoma cell lines. *Diabetes* **46**:968-977.

Hoshi M, Nishida E, Sakai H. (1988). Activation of a Ca<sup>2+</sup>-inhibitable protein kinase that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro by growth factors, phorbol esters, and serum in quiescent cultured human fibroblasts. *J Biol Chem.* **263**:5396-401.

Huang X, Hultgren B, Dybdal N, Stewart TA. (1994). Islet expression of interferon-alpha precedes diabetes in both the BB rat and streptozotocin-treated mice. *Immunity* **1**:469-478.

Hügl, S.R., White, M.F., and Rhodes, C.J. (1998). Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic  $\beta$ -cell growth is glucose-dependent: synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in Ins-1 cells. *J. Biol. Chem.* **273**:17771-17779.



Hunger RE, Carnaud C, Garcia I, Vassalli P, Mueller C. (1997) Prevention of autoimmune diabetes mellitus in NOD mice by transgenic expression of soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Eur J Immunol.* **27**:255-61.

Hunger RE, Muller S, Laissue JA, Hess MW, Carnaud C, Garcia I, Mueller C. (1996). Inhibition of submandibular and lacrimal gland infiltration in nonobese diabetic mice by transgenic expression of soluble TNF-receptor p55. *J Clin Invest.* **98**:954-61.

Iynedjian PB. (1993). Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem J.* **293** :1-13.

Jaremko J, Rorstad O. (1998). Advances toward the implantable artificial pancreas for treatment of diabetes. *Diabetes Care.* **21**:444-50.

Jhun BH, Meinkoth JL, Leitner JW, Draznin B, Olefsky JM. (1994). Insulin and insulin-like growth factor-I signal transduction requires p21ras. *J Biol Chem.* **269**:5699-704.

Jones JJ, Doerr ME, Clemmons DR. (1995). Cell migration: interactions among integrins, IGFs and IGFbps. *Prog Growth Factor Res.* **6**:319-27.

Kahn A. (2000) Converting hepatocytes to beta-cells--a new approach for diabetes? *Nat Med.* **6**:505-6.

Kahn CR. (1985). The molecular mechanism of insulin action. *Annu Rev Med.* **36**:429-51.

Kang SM, Schneider DB, Lin Z, Hanahan D, Dichek DA, Stock PG, Baekkeskov S. (1997). Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction. *Nat Med.* **3**:738-43.

Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciano P, Ulrich E, Gilbert C, Coffey P, Downward J, Evan G. (1997). Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature.* **385**:544-8.

Kaufmann M, Fischer JA, Muff R. (1993). Comparison of parathyroid hormone receptors in rat osteosarcoma cells and kidney. *Biochim Biophys Acta.* **1179**:197-202.

Kaufmann JE, Irminger JC, Mungall J, and Halban P. (1997). Proinsulin conversion in GH3 cells after coexpression of human proinsulin with the endoproteases PC2 and/or PC3. *Diabetes* **46**:978-982.

Kawahara A, Kobayashi T, Nagata S. (1998). Inhibition of Fas-induced apoptosis by Bcl-2. *Oncogene* **17**: 2549-2554.

Kloppel G, Bommer G, Commandeur G, Heitz P. (1978). The endocrine pancreas in chronic pancreatitis. Immunocytochemical and ultrastructural studies. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* **377**:157-74.

Koevary SB, Blomberg M.(1992). Prevention of diabetes in BB/Wor rats by intrathymic islet injection. *J Clin Invest.* **89**:512-6.

Kolodra TM, Finegold M, Moss L, and Woo SLC. (1995). Gene therapy for diabetes mellitus in rats by hepatic expression of insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:3293-3297.

Lacy PE. (1994) The inraislet macrophage and type I diabetes. *Mt Sinai J Med.* **61**: 170-4.

Landstrom AH, Westman J, y Borg LA. (1988) Lysosomes and pancreatic islet function. Time course of insulin biosynthesis, insulin secretion y lysosomal transformation after rapid changes in glucose concentration. *Diabetes* **37**: 309-316

Lanza RP, Cibelli JB, West MD. (1999). Human therapeutic cloning. *Nat Med.* **5**:975-7.

Leibowitz G, Beattie GM, Kafri T, Cirulli V, Lopez AD, Hayek A, Levine F. (1999) Gene transfer to human pancreatic endocrine cells using viral vectors. *Diabetes.* **48**:745-53.

Leibowitz G, Levine F. (1999). Gene therapy for type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Reviews*. **7**:124-138.

Lenmark A, Klöppel G, Stenger D, Vathanaprida C, Fält K, Landin-Olsson M; Baskin DG, Palmer JP, Gown AM, Petersen JS, Li L, Edenvall H, Mauseth RS (1995) Heterogeneity of islet pathology in two infants with recent onset diabetes mellitus. *Virchows Arch* **425**:631-640.

Le Roith, D. (1997). Insulin-like growth factors. *N. Engl. J. Med.* **336**:633-640.

Lohr M, Kloppel G. (1987). Residual insulin positivity and pancreatic atrophy in relation to duration of chronic type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and microangiopathy. *Diabetologia*. **30**:757-62.

Lowe WL. (1998). *Principles of Molecular Medicine*.(J.L. Jameson, ed.).433-442 (Humana Press Inc., Totowa, NJ).

Mabley JG, Belin V, John N, Green IC. (1997). Insulin-like growth factor I reverses interleukin-1 $\beta$  inhibition of insulin secretion, induction of nitric oxide synthase and cytokine-mediated apoptosis in rat islets of Langerhans. *FEBS Lett.* **417**:235-238.

Macfarlane WM, Shepherd RM, Cosgrove KE, James RF, Dunne MJ, and Docherty K. (2000). Glucose modulation of insulin mRNA levels is dependent on transcription factor PDX-1 and occurs independently of changes in intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Diabetes* **49**: 418-423.

Maclaren N, Lan M, Coutant R, Schatz D, Silverstein J, Muir A, Clare-Salzer M, She JX, Malone J, Crockett S, Schwartz S, Quattrin T, DeSilva M, Vander Vegt P, Notkins A, Krischer J. (1999). Only multiple autoantibodies to islet cells (ICA), insulin, GAD65, IA-2 and IA-2 beta predict immune-mediated (Type 1) diabetes in relatives. *J Autoimmun.* **12**:279-87.

Marynissen G, Aerts L, Van Assche FA. (1983). The endocrine pancreas during pregnancy and lactation in the rat. *J Dev. Physiol.* **5**:373-381.

Martin SJ.(1993). Programmed cell death and AIDS. *Science*. **262**:1355-7.

Massague J, Czech MP. (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**:5038-45

Mauricio D, Mandrup-Poulsen T. (1998). Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death. *Diabetes*. **47**:1537-43.

Mitanchez D, Doiron B, Chen R, Kahn A. (1997). Glucose-stimulated genes and prospects of gene therapy for type I diabetes. *Endocr Rev*.**18**:520-40.

Moore H-PH, Walker MD, Lee F, and Kelly RB. (1983). Expressing a human proinsulin cDNA in a mouse ACTH-Secreting cell. Intracellular storage, proteolytic processing, and secretion on stimulation. *Cell* **35**:531-538

Nagata S, Suda T. (1995) Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today*. **16**:39-43.

Nerup J, Platz P, Andersen OO, Christy M, Lyngsoe J, Poulsen JE, Ryder LP, Nielsen LS, Thomsen M, Svejgaard A. (1974). HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet*. **2**:864-6.

Newgard CB. (1994). Cellular engineering and gene therapy strategies for insulin replacement in diabetes. *Diabetes* **43**:341-349.

Newgard CB, McGarry JD. (1995). Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem*.**64**:689-719.

Newgard CB, Clark S, BeltrandelRio H, Hohmeier HE, Quaade C, Normington K(1997). Engineered cell lines for insulin replacement in diabetes: current status and future prospects. *Diabetologia*. **40** S42-7.

Newmeyer DD, Bossy-Wetzl E, Kluck RM, Wolf BB, Beere HM, Green DR. (2000). Bcl-xL does not inhibit the function of Apaf-1. *Cell Death Differ.* **7**:402-7.

Nielsen JH, Moldrup A, Billestrup N, Petersen ED, Allevato G, Stahl M. (1992). The role of growth hormone and prolactin in beta cell growth and regeneration. *Adv Exp Med Biol.* **321**:9-17.

O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, Allan DJ. (1996). Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *J Pathol.* **178**(2):176-81.

Oluwole SF, Jin MX, Chowdhury NC, Ohajekwe OA. (1994) Effectiveness of intrathymic inoculation of soluble antigens in the induction of specific unresponsiveness to rat islet allografts without transient recipient immunosuppression. *Transplantation.* **58**:1077-81.

Otaegui PJ, Ferre T, Pujol A, Riu E, Jimenez R, Bosch F. (2000). Expression of glucokinase in skeletal muscle: a new approach to counteract diabetic hyperglycemia. *Hum. Gene Ther.* **11**: 1543-1552.

Parrizas M, Saltiel AR, LeRoith D. (1997). Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem.* **272**:154-61.

Parsons JA, Hartfel MA, Hegre OD, McEvoy RC. (1983) Effect of MtTW15 mammosomatotropic tumors on pancreatic islet hormones. *Diabetes.* **32**:67-74.

Peakman M, Alviggi L, Hussain MJ, Lo SS, Hawa M, Leslie RD, Vergani D. (1994). Increased expression of T-cell markers of immunological memory associated with protection from type I diabetes. A study of identical twins. *Diabetes.* **43**:712-7.

Petersen HV, Serup P, Leonard J, Michelsen BK, Madsen OD. (1994). Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**:10465-9.

Pickup JC, Williams G. (1997) *Textbook of diabetes*, 2nd. edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.

Pictet R, Rutter WJ (1972) Development of the embryonic endocrine pancreas. In: Geiger SR (ed) *Handbook of physiology*, section 7: *Endocrinology*, vol 1. Waverley Press, Baltimore, pp 25-26.

Posselt AM, Barker CF, Friedman AL, Naji A. (1992) Prevention of autoimmune diabetes in the BB rat by intrathymic islet transplantation at birth. *Science*. **29**:1321

Posselt AM, Barker CF, Markmann JF, Roark JH, Naji A.(1992).Successful islet transplantation in the thymus of spontaneously diabetic BB rats. *Transplant Proc*. **24**:1023-4.

Printz RL, Magnuson MA, Granner DK. (1993). Mammalian glucokinase. *Annu Rev Nutr*. **13**:463-96.

Pugliese A, Zeller M, Fernandez A Jr, Zalcborg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, Pietropaolo M, Eisenbarth GS, Bennett ST, Patel DD. (1997). The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDD2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet*. **15**:293-7.

Rabinovitch A. (1994) Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes*. **43**:613-21.

Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. (1998) Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol*. **55**:1139-49.

Ramiya V K (2000). Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat. Med*. **6**:278-282.

Remuzzi G, Ruggenti P, and Mauer SM. (1994). Pancreas and kidney/pancreas transplants; experimental medicine or real improvement? *Lancet* **343**:27-31.

Rosenberg L, Brown RA, Duguid WP. (1983). A new approach to the induction of duct epithelial hyperplasia and nesidioblastosis by cellophane wrapping of the hamster pancreas. *J Surg Res.* **35**:63-72.

Rossini AA, Greiner DL, Mordes JP. (1999). Induction of immunologic tolerance for transplantation. *Physiol Rev* **79**: 99-141.

Rossini A, Appel MC, Williams RM, Like AA. (1977). Genetic influence of the streptozotocin-induced insulinitis and hyperglycemia. *Diabetes* **26**:916-920.

Rothe H, Faust A, Schade U, Kleemann R, Bosse G, Hibino T, Martin S, Kolb H. (1994). Cyclophosphamide treatment of female non-obese diabetic mice causes enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and interferon-gamma, but not of interleukin-4. *Diabetologia.* **37**:1154-8.

Ruderman NB, Kapeller R, White MF, Cantley LC. (1990). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**:1411-5.

Sander M, Griffen SC, Huang J, German MS. (1998) A novel glucose-responsive element in the human insulin gene functions uniquely in primary cultured islets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:11572-7.

Sanjeevi CB, Landin-Olsson M, Kockum I, Dahlquist G, Lernmark A. (1995) Effects of the second HLA-DQ haplotype on the association with childhood insulin-dependent diabetes mellitus. *Tissue Antigens.* **45**:148-52.

Scaglia L, Smith FE, Bonner-Weir S. (1993). Programmed cell death in postpartum involuting islets. *Diabetes* **42** 11 A.

Scaglia L, Smith FE, Bonner-Weir S. (1995). Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology* **136**:5461-8.

Schuppin GT, Bonner-Weir S, Montana E, Kaiser N, Weir GC. (1993) Replication of adult pancreatic-beta cells cultured on bovine corneal endothelial cell extracellular matrix. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **29A**:339-44.

Schwartzman RA, Cidlowski JA. (1993). Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev* **14**: 133-151.

Selden RF, Skoskiewicz MJ, Howie KB, Russell PS, Goodman HM. (1986) Regulation of human insulin gene expression in transgenic mice. *Nature.* **321**:525-8.

Sharma A, Fusco-DeMane D, Henderson E, Efrat S, Stein R. (1995). The role of the insulin control element and RIPE3b1 activators in glucose-stimulated transcription of the insulin gene. *Mol Endocrinol.* **9**:1468-76.

Simonson GD, Groskreutz DJ, Gorman CM, and Macdonald, MJ. (1996). Synthesis and processing of genetically modified human proinsulin by rat myoblast in primary cultures. *Human Gene Therapy* **7**:71-78.

Simpson AM, Tuch BE, Swan MA, Tu J, and Marshall GM. (1995). Functional expression of the human insulin gene in a human hepatoma cell line (HEP G2). *Gene Therapy* **2**:223-231.

Singer SM, Tisch R, Yang XD, Sytwu HK, Liblau R, McDevitt HO. (1998). Prevention of diabetes in NOD mice by a mutated I-Ab transgene. *Diabetes.* **47**:1570-7.

Smith FE, Rosen KM, Villa-Komaroff L, Weir GC, & S. Bonner-Weir, (1991). Enhanced insulin-like growth factor I gene expression in regenerating rat pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**:6152-6156.

Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martin F. (2000). Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes.* **49**:157-62.

Steller H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* **267**:1445-9.



Stratta RJ, Larsen JL, Cushing K. (1995). Pancreas transplantation for diabetes mellitus. *Annu Rev Med.***46**:281-98.

Sturgill TW, Ray LB, Erikson E, Maller JL. (1988). Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature.* **334**:715-8.

Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. (1997). Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med* **186**: 2045-1050.

Swenne I, Hill DJ, Strain AJ, Milner RD. (1987) Effects of human placental lactogen and growth hormone on the production of insulin and somatomedin C/insulin-like growth factor I by human fetal pancreas in tissue culture. *J Endocrinol* **113**:297-303.

Swenne I. (1992). Pancreatic beta-cell growth and diabetes mellitus. *Diabetologia.* **35**:193-201

Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S, Shiga K, Yonemura Y, Tochino Y, Okamoto H. (1988). A novel gene activated in regenerating islets. *J Biol Chem.* **263**:2111-4.

Tiedge M, Elsner M, McClenaghan NH, Hedrich HJ, Grube D, Klempnauer J, Lenzen S. (2000) Engineering of a glucose-responsive surrogate cell for insulin replacement therapy of experimental insulin-dependent diabetes. *Hum Gene Ther* **11**:403-14.

Tisch R, McDevitt H. (1996). Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* **85**:291-297.

Turk J, Corbett JA, Ramanadham S, Bohrer A, Daniel L. (1993). Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**:1458-1464.

Unger RH. (1991). Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells. *Science* **251**:1200-5.

Valera A, Fillat C, Costa C, Sabater J, Visa J, Pujol A, and Bosch F. (1994). Regulated expression of human insulin in the liver of transgenic mice corrects diabetics alterations. *FASEB J.* **8**:440-447.

Van den Brande JL, Hoogerbrugge CM, Beyreuther K, Roepstorff P, Jansen J, van Buul-Offers SC. (1990). Isolation and partial characterisation of IGF-like peptides from cohn fraction IV of human plasma. *Acta Endocrinol.* **122**:683-695.

Van Schravendijk CF, Foriers A, Van den Brande JL, Pipeleers DG. (1987). Evidence for the presence of type I insulin-like growth factor receptors on rat pancreatic alfa and beta cells. *Endocrinology.* **121**:1784-1788.

Van Schravendijk CF, Heylen L, Van den Brande JL, Pipeleers DG. . (1990) Direct effect of insulin and insulin-like growth factor-I on the secretory activity of rat pancreatic beta cells. *Diabetologia* **33**:649-53.

Waeber G, Thompson N, Nicod P, Bonny C. (1996). Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-I/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Mol Endocrinol* **10**:1327-1334.

Wang TC, Bonner-Weir S, Oates PS, Chulak M, Simon B, Merlino GT, Schmidt EV, Brand SJ. (1993). Pancreatic gastrin stimulates islet differentiation of transforming growth factor alpha-induced ductular precursor cells. *J Clin Invest.* **92**:1349-56.

Wang RN, Bouwens L, Klöppel G (1995). Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia* **38**: 1405-1411.

Watada H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Hanafusa T, Hamaguchi K, Matsuoka T, Yamamoto K, Matsuzawa Y, Kawamori R, Yamasaki Y. (1996). PDX-1 induces insulin and glucokinase gene expression in  $\alpha$ TC1clone 6 cells in the presence of beta-cellulin. *Diabetes* **45**: 1826-1831.

Withers DJ, Burks DJ, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. (1999). Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated  $\beta$ -cell development and peripheral insulin signalling. *Nat. Genet.* **23**:32-40.

Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D. (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:7324-7329.

Yoon JW, Jun HS, Santamaria P. (1998). Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity.* **27**:109-22.

Yoon JW, Jun HS. (1999). Cellular and molecular roles of beta cell autoantigens, macrophages and T cells in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Arch Pharm Res.* **22**:437-47.

Zapf J, Schoenle E, Froesch ER. (1978). Insulin-like growth factors I and II: some biological actions and receptor binding characteristics of two purified constituents of nonsuppressible insulin-like activity of human serum. *Eur J Biochem.* **87**:285-96.

Zhang Q, Berggren PO, Hansson A, Tally M. (1998). Insulin-like growth factor-1 induced DNA synthesis in insulin-secreting cell line RINm5F is associated with phosphorylation of the insulin-like growth factor receptor 1 and the insulin receptor substrate-2. *J Endocrinol* **15**: 573-581.6.