



FACULTAT DE VETERINÀRIA

**CARACTERITZACIÓ D'UN MODEL TRANSGÈNIC DE DIABETIS
AUTOIMMUNE. PAPER DE L'EXPRESSIÓ PANCREÀTICA D'IGF-I
EN LA PREVENCIÓ DE LA RESPOSTA INFLAMATÒRIA.**

ALBA CASELLAS I COMALLONGA



Universitat Autònoma de Barcelona

Memòria presentada per la llicenciada ALBA CASELLAS I COMALLONGA per optar al grau de Doctor en Bioquímica.

Aquesta Tesi Doctoral ha estat realitzada sota la direcció de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Veterinària.

ALBA CASELLAS I COMALLONGA

FÀTIMA BOSCH I TUBERT

Gener del 2003

BARCELONA

*Per tu, Raf, per estar sempre al meu costat,
per animar-me sempre i fer-me veure les
coses d'una altra manera. I perquè t'estimo.*

*Per tu, pare, per ensenyar-me sempre a superar
les coses i arribar al final, hem fet un altre cim!*

AGRAÏMENTS

Voldria donar el meu més sincer agraïment a totes aquelles persones que han fet possible la realització d'aquest treball. Abans de començar, ja sé que és la part més llegida i comentada de les tesis. Espero no oblidar-me de ningú: si ho faig, donar-li les gràcies per endavant.

En primer lloc voldria donar les gràcies a la Dra. Fàtima Bosch per acceptar-me al seu grup. Per a la seva direcció, per a la seva empenta, per la dedicació i entusiasme que dedica a la ciència. Per no cansar-se mai i per la font inesgotable d'idees. *Moltíssimes gràcies!*

Vull agrair molt especialment l'ajuda incondicional d'una persona molt especial: gràcies Ariana. No sé ni com expressar en paraules la infinitat de gràcies que t'haig de donar. Gràcies per tenir aquesta energia ja a les 8 del matí, tenir piles "Duracel" inesgotables, sense tu tot això hauria estat més difícil. Ah! Deixa-m'ho dir *gràcies bitxo!*

També m'agradaria donar les gràcies de forma especial a la Marta; Marta, sin ti gran parte del trabajo habría sido imposible. Agradecerte que nunca tengas un no, que te quedas hasta las tantas para terminar nuestras "malditas" inmunos, que te hayas exprimido las neuronas cuando no nos salía una inmuno. Por nuestras "ideas geniales", por tus vestidos, por compartir conmigo tantas cosas...

A l'Edu, per estar sempre disposat... a donar un cop de mà: - tu digues el que s'ha de fer i jo ho faig -. Per fer-me riure quan estic trista: "*♫ y el gato volador ♫*", per les teves banyes de...

A la Mire, per ser les meves mans i pulmons amb els ratolins. MOLTES GRÀCIES. Per fer-me sempre enveja: "Ah! T'agrada, doncs 900 peles...". Per pensar amb mi quan voltes pel món; bé, o fins a Cáceres!

A tu, "Garcia", per escoltar-me, aconsellar-me, però sobretot per discutir tan bé amb mi. *Ai! I per la piton...*

A la Tura i la Sylvie, ho sento, és que ja sou parella de fet! Tura, per donar-me exemple de superació i fortalesa, per les ganes de riure que tens sempre, per compartir les mateixes angoixes que jo... Sylvie, per la "buena comunicación" que tuvimos al inicio, que tiempos! Por saber siempre que hacer y decir, por escucharme y por ser mi mejor profesora. *Gràcies a les dues per ser dues grans amigues!*

Al trio calavera; l'Àlex, per tenir sempre el do de la paraula, per dir-me aquestes coses "tan boniques que em dius sempre", -Ai si jo a la teva edat estés com tu!, En Joel, per "il·luminar els dies"... per compartir afeccions i poder parlar de muntanya, bici... En Xevi, per la teva caiguda d'ulls...

En Sergio, per aguantar-me a partir de les 8 del vespre i per escriure tan i tan bé (no te enfades). L'Antonio por ser el "chico que más mal me cae" (quina sort!!).

A la Ju per assemblar-se tant a la seva "jefa", per fer-me riure tant, per ser com és, tan positiva. No canviïs. A la Meri, per quan anàvem al SAF, a partir d'ara m'hi has d'obligar! A la Vicky, per fer el chimichurri més bo que he tastat mai! I dóna les gràcies en John pel meu primer "asado", Ah! I per reduir-me allò irreduïble!

A l'Anna Vilalta, per mai dir que no, ajudar-me sempre i escoltar-me. Moltes gràcies Anna.

A l'equip del 213, primer les ANNA'S per ser les meves primeres mames! A la Puji, per ser de la terra, pel seu "Ai deixa-m'ho testar..." A l'Arbós, per transformar-se quan punxa embrions...per pensar segons què i riure...què penses Ana?. A les noves incorporacions ja ens anirem coneixent, oi Carles? I com no a la Ivet i l'Ainara!

En Carles, per solucionar-m'ho sempre tot! Mil gràcies. En Pedro, por ser el mejor, por tu avisados quedais y cómo no "el tamaño no importa"! A l'Efrén, que encara que siguis lluny! Me'n recordo del teu 4!

A la Mònica, per ensenyar-me a fer les primeres passes en el món de la ciència. En Jean Christophe, per demostrar-me com es perfora un pàncrees només amb una mà!

A la gent del 205: a la Mercè, per respondre'm sempre les mil preguntes, a l'Assumpció per ajudar-me a organitzar "festetes", en Chillón per ensenyar-me sempre...l'esquena, i en Raúl per confondre'm sempre que firma alguna cosa!

Als veïns de dalt, Joan, sort que no em vas esperar...de baix: a en Víctor, per contestar-me sempre les mil i una preguntes i en Jesús i l'Ana per un gran sopar!...Als veïns del mateix replà: l'Ernesto, l'Iván i la seva patata, a la Raquel i l'Amparo per donar-me suport quan em veien amb el "Lector", a les "Quintanilla" i els seus dolços, galetes...a la Cle i la Montse per escoltar els meus rotllos... al Néstor per ser sempre tan directe!

A l'Aurora i la Marta per compartir amb mi ratolins...

En Joaquim i a l'Anna per guiar-me en les tasques docents i compartir afeccions.

A tots els *Mus musculus*, que tot i minvar la meva qualitat de vida, han donat la seva per aquest projecte!

Aquest treball ha estat possible gràcies en primer lloc a la beca predoctoral associada al projecte del Fondo de Investigació Sanitaria (FIS 98/1063) i també per la financiació rebuda del (FIS 01/0427), a la CICYT (SAF99-0094), a la Fundació La Marató de TV3 (992710) i grups de recerca de qualitat (1999SGR 00101), (2001SGR 00195)

ABREVIATURES

ABC	complexe abidina-biotina
ADP	adenosina-5'-difosfat
AMCA	àcid 7-amino-4-metilcoumarin-3-acètic
ATP	adenosina-5'-trifosfat
APC	cèl·lula presentadora d'antigen
BAD	proteïna pro-apoptòtica
BB	rates Biobreeding Worcester
BBDR	<i>BB rats diabetes-resistant</i>
BBDP	<i>BB rats diabetes-prone</i>
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	albúmina sèrica bovina
cAMP	adenosina-5'-monofosfat cíclica
CB4	virus Cosakie B4
cDNA	DNA còpia
CCK	colecistoquinina
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
Con	control
cpm	contes per minut
CRE	element de resposta al cAMP
CSFs	factors estimuladors de colònia
DAG	diacilglicerol
dATP	desoxiadenosina-5'-trifosfat
dCTP	desoxicitidina-5'-trifosfat
dGTP	desoxiguanosina-5'-trifosfat
dl	decilitres
DAB	3'3'-diaminobenzidina
DCCT	<i>diabetes control and complications trial</i>
DNA	àcid desoxirribonucleic
EBV	virus Epstein-Barr
EDTA	etilendiaminotetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMC	virus de la encefalomiocarditis
Fas	Fas, receptor de mort cel·lular
FasL	Fas lligand
FITC	<i>fluoreceïn isothiocyanate</i>
fmol	femtomol
FSH	hormona estimulant del folicle
g	grams
G-6-Pasa	Glucosa-6-fosfatasa
GABA	àcid γ -aminobutíric
GAD	àcid glutàmic decarboxilasa

GH	hormona de creixement
GIP	pèptid inhibitori gàstric
GK	glucoquinasa
GLP-1	<i>glucagon-like peptide 1</i>
GLUT2	transportador de glucosa de tipus 2
GP	glucoproteïna
GPO	glicerol fosfat oxidasa
HGF	factor de creixement d'hepatòcits
hIFN β	interferó beta humà
HIV	human immunodeficient virus
HLA	antígens leucocitaris humans
HSP	<i>heat-shock proteins</i>
IA-2	molècula semblant a la proteïna tirosina fosfatasa
IAPP	<i>islet amyloid polipeptide</i>
IDDM	diabetis mellitus depenent d'insulina
ICA	<i>islet-cell autoantibodies</i>
ICE	enzim convertidor d'interleuquines
I- κ B	proteïna inhibidora del factor de transcripció nuclear kappa B
IFN- α	interferó alfa
IFN- β	interferó beta
IFN β /IGF-I	Animals doble transgènics RIP/IFN β i RIP/IGF-I
IFN- γ	interferó gama
IGF-I	factor de creixement similar a la insulina I
IGF-IR	receptor del factor de creixement similar a la insulina I
IGF-II	factor de creixement similar a la insulina II
IGFBP	proteïnes d'unió a factors de creixement similars a la insulina
IL	interleuquina
IP3	inositol trifosfat
IR	receptor de la insulina
IRAP	proteïna antagonista del receptor per la interleuquina 1 β
IRS-1	substrat del receptor de la insulina 1
IRS-2	substrat del receptor de la insulina 2
IRS-3	substrat del receptor de la insulina 3
IRS-4	substrat del receptor de la insulina 4
JAK	<i>Janus protein tyrosine kinase</i>
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltons
KRV	virus de Kilham
LCMV	virus de la coriomeningitis limfocitària
LPS	lipopolisacàrid
mg	miligrams
min	minuts/s
ml	mililitre
mM	milimolar

MAPK	activador mitogènic proteïna quinasa
MHC	complex major d'histocompatibilitat
MLD	<i>multiple low dosis</i>
MODY	<i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i>
mRNA	RNA missatger
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinamida-adenina-dinuclòtid fosfat oxidat/reduit
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamida-adenina-dinuclòtid oxidat/reduit
NEFA	àcid gras no esterificat
NF-κB	factor de transcripció nuclear Kappa BN
NK	cèl·lula <i>Natural Killer</i>
NO	òxid nítric
NOD	<i>non obese diabetic</i>
iNOS	òxido nítric sintasa
NP	nucleoproteïna
NPY	neuropèptid Y
³² p	fósfor 32
PAP	p-clorofenol/4-aminofenazona
pb	parells de bases
PBS	tampó fosfato-salí
PC1	proteïna convertasa 1
PC3	proteïna convertasa 3
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PDGF	factor de creixement derivat de plaquetes
PDX-1	<i>pancreatic duodenal homeobox gene</i>
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PI-3K	fosfatidil inositol 3 quinasa
PKC	proteïna quinasa C
PKB	proteïna quinasa B
PK2	piruvat quinasa 2
PEPCK	fosfoenolpiruvat carboxiquinasa
PIP2	fosfatidil inositol
PL	lactògeno placentari
PLC	fosfolipasa C
PRL	prolactina
PP	polipèptid pancreàtic
PTP	proteïnes transmembrana tirosina fosfatasa
RIA	radioimmunoassaig
RIP	promotor del gen de la insulina de rata
RIP/ hIFNβ	gen quimèric promotor RIP – cDNA IFNβ humà
RIP/ IGF-I	gen quimèric promotor RIP – cDNA de l'IGF-I
rpm	revolucions per minut
RNA	àcid ribonucleic
RNasa	ribonucleasa
SAPK2/p38	piruvat quinasa 2 activada per estrés
SDS	dodecilsulfat sòdic

SEM	error estàndar de la mitja
SSC	<i>salini sodiun citrate</i>
ssDNA	DNA d'esperma de salmó
STAT	<i>signals transducers and activators of transcription</i>
STZ	estreptozotocina (2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosourea)1-
Ddlucopyranose	
TAE	tampó tris-acetat-EDTA
Tc	limfòcid T citotòxic
TdT	dideoxinulceotiltransferasa
TE	tampó tris-EDTA
Tg	transgènic
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
Th	limfòcid T col·laborador (<i>helper</i>)
TNF- α	factor necròtic tumoral α
TNF- β	factor necròtic tumoral β
Tris	tris(hidroximetil)aminometà
TRITC	<i>texas red isothiocyanate</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP nick labeling</i>
TyK	tirosina quinasa
IU	unidats internacionals d'activitat enzimàtica
VIP	pèptid intestinal vasoactiu
vol	volum
x g	gravetats

ÍNDEX

I. PRESENTACIÓ	1
II. INTRODUCCIÓ	3
1. ESTRUCTURA I FUNCIÓ DEL PÀNCREES.	3
1.1. CÈL·LULA β PRODUCTORA D'INSULINA.	4
1.1.1. Regulació de la biosíntesi d'insulina.	5
1.1.2. Regulació de la secreció d'insulina.	6
1.1.3. Acció de la insulina.	7
2. DIABETIS MELLITUS.	9
3. DIABETIS MELLITUS DEPENDENT D'INSULINA (TIPUS 1).	11
3.1. FACTORS IMPLICATS EN EL DESENVOLUPAMENT DE LA DIABETIS TIPUS 1.	11
3.1.1. Factors genètics.	11
3.1.2. Factors ambientals.	14
3.1.2.1. Infeccions virals.	15
3.1.2.2. Efecte de la dieta.	15
3.1.2.3. Antibiòtics.	16
3.1.2.4. Estrés.	16
3.2. DESTRUCCIÓ AUTOIMMUNE.	16
3.2.1. Resposta cel·lular.	17
3.2.2. Resposta humoral.	20
3.2.2.1. Paper de les citoquines.	20
3.2.2.2. Paper dels autoantígens.	22
3.3. MODELS ANIMALS DE DIABETIS TIPUS 1.	22
3.3.1. Models murins amb diabetis espontània.	22
3.3.1.1. La rata BB (BioBreeding Worcester).	22
3.3.1.2. Ratolins NOD (non-obese diabetic).	23
3.3.2. Animals transgènics models de diabetis tipus 1.	24
3.3.2.1. Animals transgènics que expressen antígens MHC.	24
3.3.2.2. Animals transgènics que expressen citoquines.	25
3.3.2.3. Animals transgènics que expressen antígens virals.	26
3.3.3. Models de diabetis experimental.	27
3.3.3.1. Diabetis induïda per STZ.	27
4. INTERFERONS.	30
4.1. CLASSIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DELS INTERFERONS.	30
4.2. MECANISMES D'ACCIÓ I ACCIONS BIOLÒGIQUES DELS INTERFERONS.	31

4.3. ANIMALS TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN IFN β EN LES CÈL·LULES β PANCREÀTIQUES.	33
5. FACTOR DE CREIXEMENT SIMILAR A LA INSULINA TIPUS I (IGF-I).	35
5.1. ESTRUCTURA DE L'IGF-I.	35
5.2. PAPER FISIOLÒGIC I MECANISME D'ACCIÓ.	35
5.3. ANIMALS TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN IGF-I EN LES CÈL·LULES β PANCREÀTIQUES.	38
III. OBJECTIUS	39
IV. RESULTATS	40
1. RATOLINS TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN IFN β EN LES CÈL·LULES β PANCREÀTIQUES.	40
1.1. OBTENCIÓ I ANÀLISI D'ANIMALS TRANSGÈNICS RIP/hIFN β CONGÈNICS AMB LA SOCA CD-1.	40
1.2. ANÀLISI HITOLÒGICA DELS PÀNCREES DELS RATOLINS TRANSGÈNICS RIP/hIFN β .	41
1.2.1. Anàlisi de l'expressió d'hIFN β en la cèl·lula en pàncrees de ratolins RIP/hIFN β .	41
1.2.2. Anàlisi immunohistoquímica del pàncrees d'animals transgènics RIP/hIFN β .	43
1.3. DETERMINACIÓ DELS NIVELLS CIRCULANTS DE hIFN β , INSULINA I GLUCOSA EN RATOLINS TRANSGÈNICS.	44
1.4. ANÀLISI DEL GRAU D'INSULITIS DELS ANIMALS TRANSGÈNICS RIP/hIFN β .	45
2. ESTUDI DE L'EFECTE DEL TRACTAMENT AMB DIFERENTS DOSIS BAIXES D'ESTREPTOZOTOCINA (STZ) EN ANIMALS RIP/hIFN β .	47
2.1. ANÀLISI DE LA SENSIBILITAT A DOSIS DE 30 I 25 mg DE STZ EN ANIMALS TRANSGÈNICS I CONTROLS.	47
2.2. OBTENCIÓ DE RATOLINS DIABÈTICS PER TRACTAMENT AMB DOSIS DE 20 I 15 mg DE STZ.	49
2.2.1. Anàlisi del percentatge d'individus que desenvolupen diabetis tipus 1 després del tractament amb STZ.	53
2.2.2. Anàlisi immunohistoquímica per tal de caracteritzar la insulitis present en els illots dels ratolins transgènics RIP/hIFN β tractats amb 20 mg de STZ.	55
2.2.3. Determinació dels nivells circulants d'insulina.	56

2.2.4. Anàlisi morfològica dels pàncrees procedents dels ratolins transgènics RIP/hIFN β .	57
2.2.5. Anàlisi histològica de la mort cel·lular en pàncrees d'animals transgènics tractats amb STZ.	59
3. OBTENCIÓ D'ANIMALS DOBLE TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN ELS GENS QUIMÈRICS RIP/hIFNβ I RIP/IGF-I EN LES CÈL·LULES β PANCREÀTIQUES.	63
3.1. OBTENCIÓ D'ANIMALS DOBLE TRANSGÈNICS IFN β /IGF-I.	63
3.2. ANÀLISI HISTOLÒGICA DELS PÀNCREES DELS RATOLINS DOBLE TRANSGÈNICS IFN β /IGF-I.	64
3.3. ANÀLISI DEL GRAU D'INSULITIS EN RATOLINS DOBLE TRANSGÈNICS IFN β /IGF-I.	66
3.4. ESTUDI DEL TRACTAMENT AMB ELEVADES DOSIS DE STZ D'ANIMALS DOBLE TRANSGÈNICS IFN β /IGF-I.	67
3.4.1. Determinació dels nivells de glucosa basal.	69
3.4.2. Determinació dels nivells d'insulina.	69
3.4.3. Test de tolerància a la glucosa.	70
3.4.4. Anàlisi de la viabilitat dels ratolins doble transgènics IFN β /IGF-I després del tractament amb elevades dosis de STZ.	72
3.4.5. Anàlisi histològica dels pàncrees dels ratolins doble transgènics IFN β /IGF-I després del tractament amb 30 mg de STZ.	73
3.5. ESTUDI DE L'EFECTE DEL TRACTAMENT AMB 20 mg DE STZ EN ANIMALS DOBLE TRANSGÈNICS IFN β /IGF-I.	74
3.5.1. Anàlisi del grau d'insulitis dels animals dobles transgènics IFN β /IGF-I després del tractament amb 20 mg/ Kg de STZ.	75
3.5.2. Determinació dels nivells circulants d'insulina.	76
3.5.3. Anàlisi morfològica dels pàncrees procedents dels ratolins doble transgènics IFN β /IGF-I.	77
3.5.4. Anàlisi histològica dels pàncrees procedents de ratolins doble transgènics IFN β /IGF-I després del tractament amb 20 mg de STZ.	79
V. DISCUSSIÓ	81
VI. CONCLUSIONS	91
VII. MATERIALS I MÈTODES	92
1. MATERIALS.	92
1.1. ANIMALS.	92
1.2. REACTIUS.	92
1.3. SONDES.	92
1.4. OLIGONUCLEÒTIDS.	93
1.5. ANTICOSSOS.	93

2. MÈTODES.	94
2.1. OBTENCIÓ I ANÀLISI DEL DNA.	94
2.1.1. Obtenció de DNA genòmic.	94
2.1.2. Anàlisi del DNA per Southern blot.	95
2.1.3. Anàlisi del DNA per PCR.	96
2.2. DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES SÈRICS.	97
2.2.1. Glucosa.	97
2.2.2. Insulina.	98
2.2.3. IFN- β .	98
2.3. DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT D'INSULINA PANCREÀTIC.	98
2.4. CORBA DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA.	99
2.5. INDUCCIÓ DE LA DIABETIS EXPERIMENTAL MITJANÇANT STZ.	99
2.6. ANÀLISI IMMUNOHISTOQUÍMICA DEL PÀNCREES.	99
2.6.1. Morfometria del pàncrees. Determinació massa cèl·lula β .	100
2.6.2. Detecció d'apoptosi en la cèl·lula β .	101
2.6.3. Anàlisi del grau d'insulitis.	102
2.7. CÀLCULS ESTADÍSTICS.	102
VIII. BIBLIOGRAFIA	103

I. PRESENTACIÓ

La diabetis mellitus és una de les malalties metabòliques més freqüents, ja que afecta d'un 2 a un 7% de la població mundial. D'un 5 a un 10% dels pacients es poden agrupar a la categoria de diabetis mellitus tipus 1, la qual es manifesta generalment abans dels 40 anys, freqüentment durant l'adolescència, i és el resultat de la destrucció autoimmunitària de les cèl·lules β pancreàtiques.

S'ha descrit que un cert nombre de citoquines alteren la funcionalitat de les cèl·lules β , i que podrien estar involucrades en el desenvolupament de la diabetis tipus 1. L'expressió d'interferó β (IFN β) s'indueix en cèl·lules epitelials per l'acció de diferents virus. A més, s'ha detectat IFN β en illots de pacients amb diabetis tipus 1. A fi de determinar el paper d'IFN β *in vivo* en el desenvolupament de diabetis tipus 1, en el nostre laboratori s'havien obtingut animals transgènics que sobreexpressaven IFN β específicament en les cèl·lules β pancreàtiques gràcies a la utilització del promotor del gen de la insulina (RIP/IFN β). Aquests animals presentaven un estat pre-diabètic amb alteracions funcionals de la cèl·lula β pancreàtica, hiperglicèmia suau i hipoinsulinèmia.

L'objectiu del present estudi ha estat aprofundir en la caracterització dels animals transgènics RIP/IFN β en fons genètic CD1 i obtenir un nou model de diabetis tipus 1, tant per a l'estudi de la malaltia com per assajar l'efectivitat de noves teràpies. Aquests ratolins presenten una bona viabilitat i es reproduïen amb facilitat. El fet d'expressar IFN β fa que siguin més sensibles a desenvolupar diabetis, donat que presenten cert grau d'infiltració en els seus illots. Així, hem observat que el 100% d'aquests ratolins desenvolupen diabetis oberta després del tractament amb dosis molt baixes de STZ (15 o 20 mg/kg), que no afecten als seus germans control. Aquests animals transgènics presenten un increment crònic de la glicèmia i una gran infiltració limfocitària dels seus illots. En aquests infiltrats s'hi poden detectar la presència de limfòcits, tan cèl·lules T CD4⁺ com CD8⁺. Això porta a que els ratolins transgènics IFN β perdin massa de cèl·lules β per un procés apoptòtic, probablement induït pel sistema immunitari, desenvolupin hipoinsulinèmia i perdin contingut d'insulina pancreàtica, característiques totes elles de la diabetis tipus 1. Així doncs, els ratolins transgènics RIP/IFN β podrien constituir un nou model molt adequat de diabetis tipus 1 semblant a la que desenvolupen els humans.

El factor de creixement similar a la insulina de tipus I (IGF-I) estimula la proliferació i diferenciació de les cèl·lules β i és un potent factor antiapoptòtic. En el nostre laboratori s'havia obtingut una línia de ratolins transgènics que expressaven IGF-I específicament en les cèl·lules β del pàncrees (RIP/IGF-I). Aquests animals presentaven una recuperació en la massa de cèl·lula β després de la inducció de diabetis experimental mitjançant un tractament amb STZ. Amb l'objectiu de determinar el paper d'IGF-I en la contrarestació de la diabetis autoimmune hem generat animals transgènics IFN β /IGF-I. Així hem observat que l'expressió d'IGF-I en les cèl·lules β en els ratolins IFN β , protegeix aquests animals de desenvolupar diabetis després del tractament amb baixes dosis de STZ. Els animals transgènics presenten una contrarestació tan de la hiperglicèmia, hipoinsulinèmia i de la pèrdua de massa de cèl·lula β assolint valors dins de la normalitat. Tots aquests resultats indiquen que la producció local d'IGF-I protegeix a les cèl·lules β de la destrucció induïda pel sistema immune i contraresta la diabetis experimental. Per tant, la transferència del gen IGF-I a pàncrees podria ser una bona teràpia per a la diabetis tipus 1.

II. INTRODUCCIÓ

1. ESTRUCTURA I FUNCIO DEL PÀNCREES.

El pàncrees és una glàndula composta, en la que es poden distingir tant histològicament com funcionalment dues parts: el *pàncrees exocrí*, format pels *acinis* i els *conductes*, que participen en la secreció d'enzims digestius al duodè, i el *pàncrees endocrí*, format pels *illots de Langerhans*, que secreten hormones al torrent circulatori.

El pàncrees es desenvolupa a partir de dos diverticles de l'intestí primitiu embrionari. Durant l'embriogènesi, els diverticles procedents de l'intestí primitiu es fusionen per a formar la glàndula exocrina, connectada mitjançant conductes a l'intestí on hi abocaran els enzims digestius.

Els acinis del pàncrees exocrí constitueixen el 80-85% del total de les cèl·lules pancreàtiques, i estan formats per agrupacions de cèl·lules epitelials, les *cèl·lules acinars*, orientades en sentit radial formant una llum, *el lumen*, que comunica amb els conductes pancreàtics. Aquests formen un entramat de comunicació entre els acinis i la llum del duodè. La funció de les cèl·lules acinars és la de síntesi, l'emmagatzament i la secreció dels enzims digestius pancreàtics. Aquests són emmagatzemats a l'interior de les cèl·lules en els anomenats grànuls de zimògen.

Els diverticles procedents de l'intestí primitiu generen estructures de forma allargada que ramifiquen originant els conductes pancreàtics. A partir de les cèl·lules epitelials d'aquestes estructures es comencen a formar els illots. En un inici apareixen cèl·lules endocrines aïllades en les parets dels conductes i posteriorment migren formant petits grups al seu voltant, que finalment s'organitzen en estructures ben definides donant origen als illots de Langerhans (Deltour, 1991). Progressivament, vasos sanguinis i fibres del sistema nerviós perifèric migren també cap a les porcions endocrines i exocrines del teixit. Com a conseqüència, a més de cèl·lules secretores endocrines, els illots contenen abundants cèl·lules endotelials capil·lars, així com una bona inervació (Pickup, 1997).

La fracció endocrina del pàncrees constitueix només un 1% del total de la massa pancreàtica. Els illots estan envoltats per una càpsula de teixit connectiu característica que els aïlla del teixit exocrí i els ajuda a mantenir la seva integritat estructural. Aproximadament, hi ha un milió d'illots repartits en els pàncrees humans, entre 1000 i 2000 en les rates i uns 500 en els pàncrees dels ratolins. Cada illot conté aproximadament 2000 cèl·lules

productores d'hormones. De fet l'illot és un mosaic cel·lular amb diversos tipus de cèl·lules, que secreten diferents hormones. Es tracta d'un òrgan endocrí amb funcions complexes, moltes de les quals encara són poc clares. Els illots estan constituïts per quatre tipus cel·lulars: les cèl·lules β productores d'insulina, que són les més abundants (60-70%) i estan situades al centre de l'illot; les cèl·lules α , productores de glucagó, que suposen aproximadament el 15% de la massa total i estan situades a la perifèria de l'illot; les cèl·lules δ productores de somatostatina, representen només el 5% de la població cel·lular de l'illot i es situen juntament amb les cèl·lules γ productores de polipèptid pancreàtic (PP) entremig de les cèl·lules β i les α . Aquestes últimes constitueixen el 10% de la massa total de l'illot. Les hormones produïdes són alliberades directament al capil·lars sanguinis i, a través de la vena porta, són transportades cap al fetge i a la resta de l'organisme.

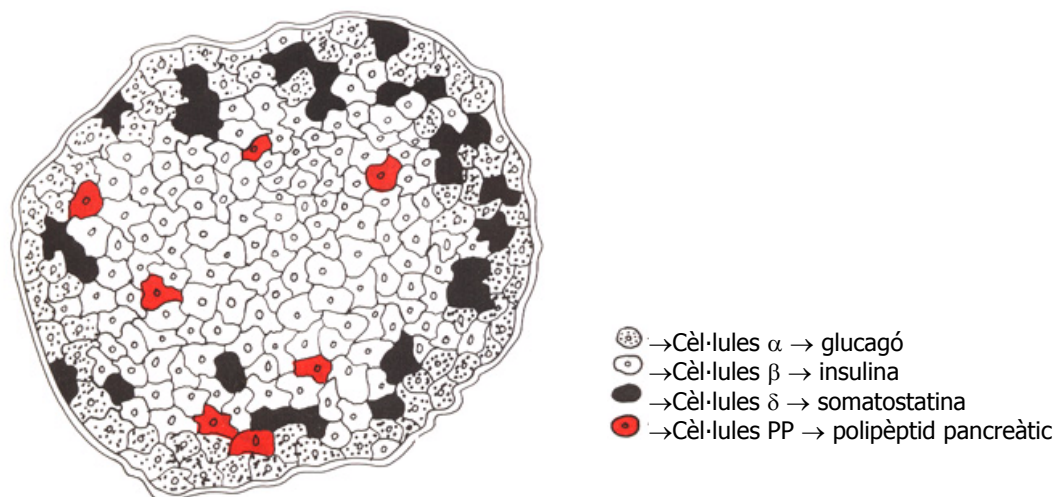


Figura 1. Distribució dels diferents tipus cel·lulars als illots de Langerhans.

1.1 CÈL·LULA β PRODUCTORA D'INSULINA.

Les cèl·lules β són les responsables del manteniment dels nivells de glucosa del cos. La seva població és dinàmica i està sotmesa a canvis per tal de mantenir l'euglicèmia. La cèl·lula β s'origina directament des d'una cèl·lula epitelial precursora, la qual expressa marcadors específics (NeuroD, Isl1, Pax6, PDX1, Nkx6.1, i INS) (Jensen, 2000) que la faran diferenciar fins a cèl·lula β madura. Tot aquest procés és complex i està altament regulat. Un cop diferenciades i formant part de l'illot, la massa de cèl·lules β està en una continua renovació i

mort. Aquesta remodelació depèn de diferents mecanismes: replicació, neogènesi, canvis de volum cel·lular i mort. La *replicació* és el mecanisme pel qual es genera una nova cèl·lula β a partir d'una ja existent. La *neogènesi* és el mecanisme pel qual es genera una nova cèl·lula β a partir d'un precursor epitelial de manera similar a com passaria durant el desenvolupament. Els canvis de *volum cel·lular* suposen un augment de la mida de la cèl·lula, és el que es coneix com a hipertròfia. I *la mort* és un procés en el que podem diferenciar dos mecanismes: la necrosi i l'apoptosi.

1.1.1. Regulació de la biosíntesi d'insulina.

La insulina és la principal de les hormones pancreàtiques. L'estructura molecular de la insulina està altament conservada durant l'evolució. Així, des de la insulina dels vertebrats més primitius fins a la de l'home difereix únicament en uns pocs aminoàcids. La síntesi de la insulina és un procés complex que involucra la formació de dues molècules precursors, la proinsulina i la preproinsulina. La preproinsulina passa del ribosoma al reticle endoplasmàtic on és degradada per proteases específiques, d'aquesta manera la preproinsulina és transformada en proinsulina. La proinsulina està formada per 86 aminoàcids amb tres ponts disulfur. La proinsulina és transformada a insulina dins de grànuls específics que provenen de l'aparell de Golgi. Dins d'aquests grànuls les proteases, activades per un pH àcid, trenquen un pèptid de connexió anomenat *pèptid C*, que uneix les cadenes A i B de la insulina, alliberant-se la insulina madura i amb activitat biològica.

La insulina humana té un pes molecular d'uns 6000 D i conté 51 aminoàcids repartits en les dues cadenes polipeptídiques A i B. La cadena A conté 21 aminoàcids i la cadena B 30 aminoàcids. A la molècula d'insulina hi ha tres ponts disulfur, dos d'intercatenaris que uneixen les dues cadenes i un d'intracatenari situat a la cadena A.

En sang podem mesurar tant la insulina com el pèptid C, sent la proinsulina pràcticament insignificant. La determinació del pèptid C pot ésser d'interès, donat que la relació insulina pèptid C és constant i la seva vida mitja és més llarga. La insulina es troba normalment en circulació en una concentració al voltant de 10^{-10} M, concentració a la qual circula en forma de monòmer. A concentracions elevades pot formar dímers i en presència de Zinc, a pH àcid, la insulina forma cristalls compostos d'hexàmers de l'hormona. Aquesta és també la forma en què s'emmagatzema en els grànuls de secreció.

El regulador més important de la síntesi de la insulina és la glucosa, actuant bàsicament a través de 3 mecanismes: a) mitjançant un increment selectiu de la transcripció del gen de la insulina, b) una estabilització selectiva dels RNA missatgers (RNAm) de la insulina i c) una ràpida i selectiva estimulació de la traducció dels RNAm de la insulina (Steiner, 1989). No estan massa clars els missatgers intracel·lulars implicats en l'efecte de la glucosa en la síntesi d'insulina, el que sí és clar és que la glucosa ha de ser metabolitzada dins la cèl·lula β perquè pugui produir-se l'efecte.

1.1.2. Regulació de la secreció d'insulina.

L'estímul més important de la secreció d'insulina és la glucosa. La cèl·lula β es comporta com un sensor de glucosa, sent sensible a petites variacions de la concentració de glucosa en sang. Existeixen però altres factors reguladors com poden ser: nutrients, neurotransmisors i hormones. Dins del grup dels nutrients hi trobem diversos sucres (manosa), aminoàcids (leucina i arginina), cossos cetònics i àcids grassos que actuen com a secretagogs. De neurotransmisors, n'hi ha amb efecte estimulador: acetilcolina i *Vasoactive Intestinal Peptide* (VIP); mentre que d'altres tenen un efecte inhibidor, com les catecolamines. Pel que fa a les hormones, hi ha potents estimuladors com: el glucagó, el *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1), el *Gastric Inhibitory Peptide* (GIP), la colecistoquinina (CCK); i també n'hi ha d'inhibidors, com la somatostatina.

La resposta de la cèl·lula β als reguladors fisiològics és molt ràpida, la secreció es produeix pocs segons després d'haver rebut l'estímul o s'anul·la pocs segons després de la seva exposició a un estímul inhibitori. El fet que la cèl·lula β pugui respondre a diferents estímuls implica que ha d'estar equipada amb els mecanismes sensors i efectors específics per cadascun dels sistemes reguladors. A més a més, hi ha un acoblament entre els sistemes sensors i efectors responsables de l'exocitosi dels grànuls d'insulina. Això implica diversos senyals intracel·lulars, que fins al moment no estan gens clars. El que sí es coneix, és que el calci (Ca^{2+}) té un paper important com a senyal primari per l'activació del procés de secreció, i l'AMPc (té un paper important) en la modulació de la magnitud d'aquesta resposta. Així, els diversos efectors (nutrients, neurotransmisors i hormones) actuarien provocant variacions en les concentracions intracel·lulars de calci i AMPc que farien de missatgers dins la cèl·lula β . El metabolisme de la glucosa és important pel seu efecte sobre la secreció de la insulina (Bell, 2001). La glucosa entra dins la cèl·lula β a través del transportador de glucosa GLUT2, un cop a dins, és fosforilada en posició 6 transformant-se en glucosa-6-fosfat per l'acció de la

glucoquinasa. Tant el transportador GLUT2 com l'enzim glucoquinasa, actuen de sensors de la glucosa, modulant la secreció d'insulina. De fet, la glucoquinasa controlaria la ratio d'entrada de glucosa a la via glucolítica i el seu subseqüent metabolisme (Bell, 2001). És el metabolisme de la glucosa dins la cèl·lula β el que genera el senyal perquè es produeixi la secreció d'insulina. En realitat aquest senyal és l'ATP generat tant en la glucòlisi com en el cicle de Krebs. Aquest augment de l'ATP intracel·lular provoca el tancament dels canals de potassi (K^+) dependents d'ATP, i com a conseqüència es produeix una despolarització de la membrana i una entrada de Ca^{2+} a l'interior cel·lular. A més a més, l'acció de diversos secretagogs (nutrients, neurotransmisors com l'acetilcolina i hormones com la CCK) estimulen a la fosfolipasa C (PLC) a escindir el fosfatidil inositol (PIP2) generant-se molècules d'inositol trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG). L'IP3 permet l'alliberació del Ca^{2+} emmagatzemat en el reticle endoplasmàtic i activa la proteïna quinasa depenent de calmodulina. Per altra banda, el DAG estimula a la proteïna quinasa C (PKC), la qual permetrà la fosforilació de diverses proteïnes intracel·lulars que regularan l'exocitosi dels grànuls d'insulina. Tot aquest conjunt de senyals provoca tant la fusió dels grànuls de secreció amb la membrana plasmàtica, alliberant-se la insulina a la circulació, com la síntesi de nova insulina.

1.1.3. Acció de la insulina.

La principal funció de la insulina és mantenir la homeòstasi de la glucosa, mitjançant l'estimulació de la utilització de glucosa en els teixits perifèrics, múscul i teixit adipós, i la inhibició de la producció de glucosa hepàtica i l'activació de la síntesi de glicogen al fetge. Perquè la insulina pugui produir els seus efectes biològics sobre el metabolisme de la glucosa, és necessari que primer s'uneixi a receptors específics presents a tots els teixits diana de l'hormona (Cheatham, 1995; Saltiel, 2001). Un cop la insulina s'ha unit al receptor específic, es generen segons missatgers intracel·lulars que iniciaran una cascada de senyals de fosforilacions i desfosforilacions resultant en una estimulació del metabolisme de la glucosa, transcripció de gens, síntesi proteica, etc.

El receptor de la insulina (IR) pertany a una subfamília de receptors tirosina quinasa, que inclou també al receptor del factor de creixement similar a la insulina-I (IGF-IR). Aquests receptors són tetramèrics amb 2 subunitats reguladores α , i 2 subunitats catalítiques β . La unió de la insulina a la subunitat α indueix l'activació de les subunitats β que seguidament

s'autofosforilaren. Això produeix un canvi conformacional que fomentarà l'increment de l'activitat quinasa (Patti, 1998).

Almenys es coneixen 9 substrats intracel·lulars dels receptors tirosina quinasa de la insulina i IGF-I. Quatre d'aquests substrats pertanyen a una família de proteïnes anomenada substrats del receptor de la insulina (IRS) (White, 1998). Encara que les proteïnes IRS tenen una elevada homologia, estudis recents en animals deficients (knock-out) i línies cel·lulars suggereixen que tenen una funció complementària més que redundant en la senyalització de la insulina/IGF-I. Els ratolins deficients homozigots per IRS1(-/-) mostren un retard en el creixement tant pre com post-natal. Així com una marcada resistència a la insulina en els teixits perifèrics i una alteració en la tolerància a la glucosa (Tamemoto, 1994; Araki, 1994). Els ratolins deficients per IRS2 també mostren resistència a la insulina en teixits perifèrics i fetge, però el seu retard en el creixement només afecta a determinats teixits, incloent certes regions del cervell, illots pancreàtics i retina. En els ratolins homozigots IRS2(-/-), l'efecte multifactorial de la resistència a la insulina i la disminució en la massa de cèl·lula β provoca el desenvolupament de diabetis tipus 2 (Kido, 2000; Withers, 1998). Per contra, ratolins deficients per IRS3 i IRS4 tenen un creixement i un metabolisme aparentment normal (Fantin, 2000).

Les alteracions funcionals de les cèl·lules β pancreàtiques i alteracions en el mecanisme d'acció de la insulina, tenen com a conseqüència greus problemes metabòlics com el desenvolupament de la diabetis mellitus.

2. DIABETIS MELLITUS.

La diabetis mellitus és la malaltia metabòlica més comú. Inclou un ampli ventall de síndromes amb diferents etiologies que afecten d'un 2 a un 7% de la població mundial. La diabetis es pot classificar en dues categories: la diabetis tipus 1 i la diabetis tipus 2. La primera categoria (diabetis tipus 1), és causada per l'absoluta deficiència en la secreció d'insulina. I la segona categoria (diabetis tipus 2), és causada per la combinació d'una resistència a l'acció de la insulina i una inadequada resposta compensatòria de la secreció d'aquesta hormona (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997).

La diabetis tipus 1 afecta aproximadament a un 10% dels pacients diabètics i sol aparèixer abans dels 30 anys (Lowe, 1998). És deguda a la destrucció autoimmune de les cèl·lules β dels illots pancreàtics. Aquestes cèl·lules són les productores d'insulina i com a conseqüència de la seva destrucció es produeix una gran disminució de l'hormona. La principal alteració metabòlica causada per la manca d'insulina és la hiperglicèmia. Aquesta és deguda a la incapacitat dels teixits perifèrics (múscul, teixit adipós) i del fetge de metabolitzar la glucosa. El problema s'agreuja pel fet que el fetge posa en marxa la via gluconeogènica i glucogenolítica, contribuint d'aquesta manera a augmentar encara més els nivells de glucosa sanguínia. Per altra banda, els pacients diabètics necessiten obtenir energia d'altres substrats. Aquesta font alternativa d'energia són els cossos cetònics provinents de la mobilització d'àcids greixosos lliures des del teixit adipós i la seva posterior oxidació en el fetge. La producció de cossos cetònics porta a una cetoacidosi. La conseqüència d'aquest conjunt d'alteracions metabòliques resulta en una marcada hiperglicèmia i cetonèmia. A més, es manifesten els símptomes característics de la diabetis: un increment de la ingesta (polifàgia) i un increment de la set (polidípsia), una diüresi osmòtica (poliúria) i a una pèrdua de pes. Altres alteracions són la hipertrigliceridèmia, alteració del sistema renina-angiotensina, funció leucocitària alterada, etc. (Pickup, 1997).

La teràpia substitutòria amb insulina és imprescindible, no només per controlar la hiperglicèmia sinó també per evitar la cetosi espontània que pot portar al coma diabètic o fins i tot a la mort del pacient. Això no evita però, que molts dels pacients acabin desenvolupant el conjunt de patologies secundàries associades a la diabetis: alteracions microvasculars en el ronyó, retina, alteracions macrovasculars, i complicacions neurològiques.

La diabetis tipus 2 la presenten al voltant del 90% dels pacients diabètics i apareix normalment en individus majors de 40 anys. En aquest cas, no és deguda a cap atac immunitari sinó que inclou una sèrie de patologies amb característiques comuns. Per aquesta raó, es defineix a la diabetis tipus 2 com una síndrome. No es caracteritza per una absència d'insulina, si més no en els estadis inicials, sinó que és el resultat d'una resistència a l'hormona a nivell del fetge i teixits perifèrics, acompanyada d'un defecte en la secreció de la insulina (Lowe, 1998).

Les causes que indueixen a desenvolupar diabetis tipus 2 encara són desconegudes. Factors genètics, tot i que no es coneixen bé, conjuntament amb factors ambientals condueixen a una disfunció de la cèl·lula β que no pot alliberar d'una forma regulada la insulina en resposta a la glucosa. A més a més, es produeix una resistència a la insulina per part dels teixits perifèrics que condueix a una disminució de la utilització de glucosa en aquests teixits i a un augment de la producció hepàtica de glucosa. Les causes moleculars de la resistència a l'hormona són diverses i es coneixen només parcialment. Se sap que la disminució en el nombre de receptors d'insulina i mutacions en el propi receptor pot alterar-ne l'afinitat per l'hormona. També són causa de resistència les alteracions postreceptor, que podrien afectar a la transducció de la senyal de la insulina (Bell, 2001). D'altra banda, cal considerar també, les alteracions dels mecanismes de transport de glucosa i la seva utilització.

Independentment de la causa, la resistència a la insulina desencadena l'augment de la glucèmia, fet que pot comportar un efecte tòxic per la pròpia cèl·lula β . En general els pacients de diabetis tipus 2 reben com a tractament una dieta restringida, donat que sovint una disminució de l'obesitat condueix a una substancial millora en la malaltia. Alguns, a més es tracten amb hipoglucemians orals, però, els pacients que finalment progressen cap a un estat de deficiència d'insulina han d'acabar tractant-se amb l'hormona per sobreviure (Moller, 2001).

3. DIABETIS MELLITUS DEPENDENT D'INSULINA (TIPUS 1).

La diabetis tipus 1 és deguda a la deficiència d'insulina com a resultat de la destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques. Quan es presenten els símptomes ja s'han destruït aproximadament el 90% de les cèl·lules β , mentre que les cèl·lules productores de glucagó, somatostatina i polipèptid pancreàtic normalment es preserven, tot i que, solen redistribuir-se dins l'illot.

En la patogènesi de la diabetis tipus 1 hi ha involucrats factors ambientals que activarien mecanismes autoimmunitaris en individus genèticament susceptibles, provocant la progressiva pèrdua de les cèl·lules β pancreàtiques (Zimmet, 2001). La predisposició és mitjançada per un conjunt de gens que interactuen entre ells i amb l'ambient. Estudis genètics de la diabetis tipus 1 indiquen que en la susceptibilitat a desenvolupar la malaltia és particularment important el complex major d'histocompatibilitat (HLA), situat en el cromosoma 6. S'han descrit varis loci que estan implicats en la predisposició i/o acceleració del desenvolupament de la malaltia (Freiesleben De Blasio, 1999) com ara els diferents loci que codifiquen per MHC, referits col·lectivament com *IDDM1* (Todd, 1996). Estudis amb bessons, individus genèticament idèntics, demostren que els factors ambientals també participen en la generació de diabetis tipus 1. Dades epidemiològiques donen suport a la idea que diversos factors ambientals poden iniciar o accelerar el progrés de la malaltia. De particular interès ha estat mostrar el possible paper que juguen les infeccions, substàncies químiques i nutrients (Haverkos, 1997).

3.1. FACTORS IMPLICATS EN EL DESENVOLUPAMENT DE LA DIABETIS TIPUS 1.

3.1.1. Factors genètics.

Dos descobriments als anys 70 van permetre establir els factors genètics implicats en l'inici de la malaltia. El primer dels descobriments va ser demostrar el fort lligam entre diabetis tipus 1 i polimorfismes concrets del HLA classe II -DR i més tard del -DQ (Nerup, 1974). De fet, s'ha trobat una forta associació entre els haplotips de HLA DQA1*0301-B1*0302, especialment combinat amb DQA1*0501-B1*0201, i la diabetis tipus 1 en individus Caucàsics (Kelly, 2001). Altres haplotips presenten una correlació negativa amb la malaltia (Graham, 1999). Així doncs, els genotips de HLA han estat un important punt de recerca per identificar

els individus amb un risc de desenvolupar diabetis tipus 1. A més, les molècules de HLA tenen un paper important en la presentació dels antígens i aquesta associació reforçaria la hipòtesi de que la diabetis tipus 1 és una malaltia autoimmunitària (Wolf, 1983). Se sap que més del 98% dels pacients diabètics posseeixen els al·lels de HLA de classe II DR3 o DR4.

El segon dels descobriments, va ser demostrar les evidències directes entre autoimmunitat i diabetis tipus 1. Així en incubar sèrum de pacients diabètics amb seccions de teixit procedents d'individus normals, es van identificar anticossos als quals se'ls va anomenar anticossos contra cèl·lules de l'illot (ICAs) (Bottazzo, 1974). Aquests ICAs han estat àmpliament utilitzats per l'estudi clínic del curs de la patogènesi de la diabetis tipus 1.

Els anys 80 i principis dels 90 van ser identificats dos dels principals autoantígens reconeguts com ICA. El primer va ésser una nova isoforma de la àcid glutàmic descarboxilasa (GAD65) (Baekkeskov, 1982; Baekkeskov, 1990), i el segon va ser la molècula semblant a la proteïna tirosina fosfatasa (IA-2) (Lan, 1996). El tercer autoantígen, identificat a la dècada dels 80, va ser la insulina (Palmer, 1987).

Existeixen dues isoformes d'àcid glutàmic descarboxilasa (GAD), una amb un pes molecular de 65000 D (GAD65) i una altra amb 67000 D (GAD67). GAD65 és l'encarregat de la conversió de l'àcid glutàmic a àcid γ -aminobutíric (GABA), un neurotransmissor. Les dues isoformes s'expressen a les neurones i a les cèl·lules dels illots pancreàtics, però és la isoforma 65 la que hi és predominant. La funció de GAD65 en els illots no és clara.

L'IA-2, també conegut com ICA512, és un membre de la família de proteïnes transmembrana tirosina fosfatasa (PTP). És una proteïna de 106.000 D i 979 aminoàcids, que s'expressa en teixits neuroendocrins i en els illots s'expressa tant en les cèl·lules α com en les cèl·lules β . Estudis d'immunofluorescència la localitzen en vesícules secretores d'ambdues cèl·lules, endocrines i neuronals, però la seva funció és desconeguda. Existeix un altre autoantígen en diabetis tipus 1 que forma part d'aquesta família, és el IA-2 β , també conegut com a "phogrin" (Lu, 1996).

A diferència dels altres dos antígens, els autoanticossos contra insulina, no es poden utilitzar per l'estudi i evolució de la malaltia un cop iniciat el tractament amb l'hormona, donat que els pacients desenvolupen també anticossos contra la insulina exògena.

S'han trobat autoanticossos contra altres antígens: carboxipeptidasa H, ICA69, GLUT-2, SOX-13, i "β cell sulfatides". Però aquests es troben amb menys freqüència que els autoanticossos contra GAD65/IA-2/insulina, que són els que s'utilitzen rutinàriament en estudis clínics.

S'han realitzat centenars d'estudis arreu del món per trobar la relació entre autoanticossos i diabetis tipus 1. Aproximadament el 70-80% dels pacients nou diagnosticats tenen autoanticossos contra GAD65. Un nombre semblant de pacients tenen autoanticossos contra IA-2. Un nombre molt menor de pacients presenta autoanticossos contra insulina. Això és degut a l'efecte de l'edat, si els pacients són nens presenten amb una freqüència més elevada autoanticossos contra insulina que no pas els pacients joves o adults (Hagopian, 1995). En general, durant el curs de la malaltia la presència d'autoanticossos contra GAD65 tendeix a ser estable, mentre que la presència d'autoanticossos contra IA-2 tendeix a disminuir al llarg de la malaltia.

Encara que inicialment l'estudi dels autoanticossos se centri en l'inici i evolució de la malaltia, sembla ser que aquests autoanticossos precedeixen al desenvolupament de la malaltia en mesos o fins i tot anys (Leslie, 2001). L'associació entre el risc de desenvolupar diabetis tipus 1 i la presència d'autoanticossos, ha estat subjecte de molts estudis. Un estudi demostra que la presència d'ambdós anticossos contra GAD65 i IA-2, comporta un risc del 50% a desenvolupar diabetis en 5 anys, i el risc augmenta molt en 10 anys (Leslie, 1999). Altres estudis demostren que si un individu presenta a més dels anticossos contra GAD65 i IA-2, anticossos contra insulina, el risc a desenvolupar diabetis en 5 anys augmenta fins al 70% (Verge, 1996).

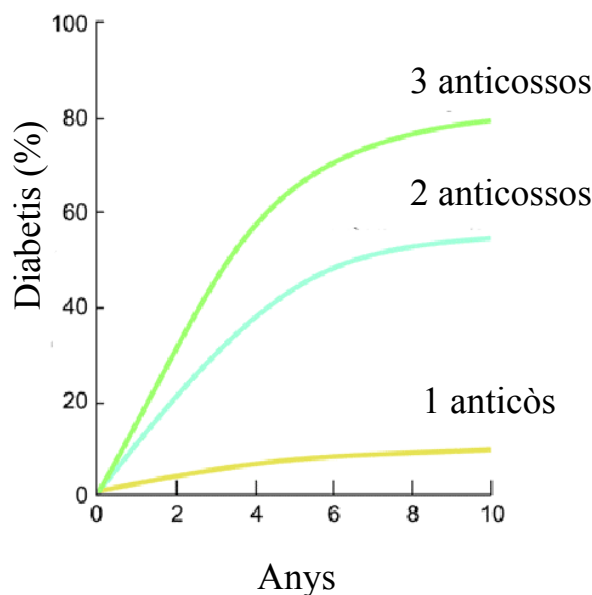


Figura 2. Representació de l'efecte de múltiples anticossos (GAD65, IA.2 o insulina) sobre el risc de desenvolupar diabetis tipus 1. Es representa el percentatge de pacients que desenvolupen diabetis. (Notkins, 2001).

3.1.2. Factors ambientals.

En l'etiologia de la diabetis tipus 1 hi ha involucrats a part dels factors genètics, factors ambientals. Així, la falta de concordança del 100% en germans bessons monozigòtics suggereix un paper significatiu dels factors ambientals (Lowe, 1998). L'influència de l'ambient sembla important quan es fan estudis de prevalència en diferents poblacions. Així, poblacions asiàtiques presenten una prevalència molt baixa de la malaltia. Pel contrari, Finlàndia presenta la incidència més gran del món amb 35 casos per cada 100.000 habitants. Això difereix de la resta de poblacions Bàltiques, amb les que tenen ètnies similars, on la incidència és molt més baixa. Per tant, els factors ambientals tindrien un paper important en el desenvolupament de la malaltia, influenciant a individus genèticament sensibles (Tuomilehto, 1992; Zimmet, 2001). Els agents ambientals que precipitarien l'inici de la malaltia són molt difícils d'identificar. Es postula l'existència de diferents tipus de factors acceleradors com ara: infeccions virals (per exemple coxsackie virus i cytomegalovirus), alletament prematur amb llet de vaca, infeccions prenatales, toxines (per exemple nitrosamines de la dieta, antibiòtics com bafilomycina i canamycina A), i l'administració de vacunes (Zimmet, 2001).

3.1.2.1. Infeccions virals.

Durant anys s'ha postulat la possible implicació dels virus en el desenvolupament de la diabetis tipus 1. S'especula que infeccions víriques cròniques o latents dels illots puguin ser la causa primària que desencadena el procés autoimmunitari mitjançant múltiples mecanismes, bé siguin directes interactuant amb les cèl·lules diana, com indirectes interferint en les funcions del sistema immunitari. Alguns virus poden actuar destruint directament les cèl·lules β , o bé, induint l'atac autoimmunitari contra elles (Horwitz, 2001). Els Coxsackie virus han estat llargament associats amb el desenvolupament de la diabetis tipus 1 (Andreoletti, 1997). Els Coxsackie virus B4 (CB4) infecten el pàncrees i poden destruir les cèl·lules β per accions citolítiques directes. A més, ho poden fer indirectament induint l'atac immunitari a través de l'antígen viral (P2-C), que pot presentar correlació amb l'autoantígen GAD 65, especialment en individus susceptibles. Alternativament, una persistent presència de coxsackie virus en les cèl·lules β pot estimular la síntesi d'interferons de tipus I i la hiperexpressió d'antígens HLA de classe I (Jaeckel, 2002).

També s'han identificat retrovirus en el citoplasma de les cèl·lules β , juntament amb seqüències genòmiques retrovíriques específiques en pacients amb diabetis tipus 1. A més, els autoanticossos d'insulina en pacients diabètics poden reaccionar amb antígens retrovírics específics (p73) (Jaeckel, 2002).

Altres virus implicats en la diabetis humana inclouen el virus de la Rubeola, el Cytomegalovirus (CMV) i l'Epstein-Barr virus (EBV), els quals porten antígens específics que poden reaccionar amb la cadena β de l'antígen HLA-DQ (classe II). D'altra banda, s'han identificat altres virus diabetogènics en ratolins i rates. El virus de la encefalomiocarditis (EMC) s'ha identificat en ratolins, i el virus de Kilham (KRV) en rata. Ambdós, afecten només a soques susceptibles (Jaeckel, 2002).

3.1.2.2. Efecte de la dieta.

Alguns estudis suggereixen que les dietes prematures amb llet de vaca riques en albúmina sèrica bovina (BSA) en nens, podrien induir el desenvolupament de diabetis. S'ha observat que un epítop de la BSA (ABBOS) té una alta homologia amb els antígens HLA de classe II i amb les proteïnes del xoc tèrmic (HSP) expressades en la cèl·lula β (Schrezenmeir, 2000). Altres factors potencialment diabetogènics són les nitrosamines, es troben sobretot en el fum del tabac i en les carns curades. En animals susceptibles (rates BB), proteïnes com el gluten

poden ser diabetogèniques, i hi estan involucrats els antígens del complex major d'histocompatibilitat (MHC) de classe I (Zimmet, 2001).

3.1.2.3. Antibiótics.

S'ha descrit que petites quantitats de l'antibiòtic bafilomycin A1 (bafA1) causen una reducció de la tolerància a la glucosa i una disfunció dels illots pancreàtics, en ratolins (Myers, 2001). BafA1 és produït per espècies de *Streptomyces*. Les espècies de *Streptomyces* també són les productores del tòxic streptozotocina, un agent utilitzat per generar diabetis experimental a ratolins, tant per l'administració d'una sola dosi, com per l'administració de dosis múltiples. Les espècies de *Streptomyces* són ubiqües i presents en el sòl, i alguns poden infectar tubercles com les patates (Myers, 2001). Així doncs, l'exposició continuada a la toxina del *Streptomyces* podria generar dany crònic en les cèl·lules β de l'illot i provocar diabetis autoimmune en individus genèticament susceptibles.

3.1.2.4. Estrés.

L'estrés també pot afavorir el desenvolupament de diabetis autoimmune, ja sigui estimulant la secreció d'hormones contrareguladores, o modulant l'activitat del sistema immune (Zimmet, 2001).

3.2. DESTRUCCIÓ AUTOIMMUNE.

El sistema immunitari és capaç de distingir entre "propi" i "no propi". D'aquesta manera pot respondre a un gran espectre de substàncies alienes però és específicament insensible a les molècules pròpies, fenomen que s'anomena tolerància. El reconeixement de les substàncies estranyes beneficia l'organisme, protegint-lo contra infeccions (immunitat), mentre que una alteració en els mecanismes de reconeixement entre "propi" i "no propi" té com a conseqüència un atac contra els propis teixits de l'animal (autoimmunitat) (Lipes, 1990). Molts investigadors, sobretot en els últims 30 anys, han implicat la resposta immunitària amb la patogènesi de la diabetis tipus 1, però encara no està clar l'inici d'aquest procés. El que sí és clar és que hi intervenen autoantígens específics, cèl·lules presentadores d'antígens, i limfòcits T i B.

En la diabetis tipus 1 humana es destrueixen específicament les cèl·lules β pancreàtiques, productores d'insulina, sense que se'n vegin afectades les cèl·lules endocrines veïnes.

L'estudi de la reacció autoimmune contra les cèl·lules β pancreàtiques utilitzant 2 models animals de diabetis tipus 1, ratolins "nonobese diabetic (NOD)" i les rates "BioBreeding (BB)", i pacients humans, ha permès entendre millor la patogènesi de la diabetis (Yoon, 1998).

Podríem dividir la resposta immunitària humana en resposta humoral i resposta cel·lular. Aquestes dues respostes actuarien per separat i interactuant de forma molt complexa entre elles.

3.2.1. Resposta cel·lular.

La majoria de cèl·lules trobades en els illots infiltrats durant els primers estadis d'insulitis en els models animals de diabetis, rates BB i ratolins NOD, són macròfags i cèl·lules dendrítiques (Yoon, 1998). Aquesta infiltració precedeix la invasió dels illots per limfòcits T, cèl·lules "Natural Killers" NK i limfòcits B. H.S.Jun *et al.* van demostrar que els macròfags tenen un paper essencial en el desenvolupament i activació de cèl·lules T contra les cèl·lules β pancreàtiques, causant-ne la seva destrucció que portarà al desenvolupament de diabetis en els ratolins NOD (Jun, 1999).

En un inici, es pensava que les cèl·lules B només tenien un paper en la producció d'autoanticossos contra els autoantígens de les cèl·lules β pancreàtiques, i se'l considerava un fenomen secundari de la destrucció de les cèl·lules β dels illots. Però hi ha estudis que demostren que ratolins NOD deficients de cèl·lules B no desenvolupen diabetis (Andersson, 1991). La depleció de les cèl·lules B per tractament amb anti- μ , un anticòs específic contra la cadena pesada de les IgM (μ), aboleix completament el desenvolupament d'insulitis (Noorchashm, 1997). Això sembla indicar que les cel·lules B tenen un paper important en el desenvolupament de la diabetis tipus 1.

Estudis amb ratolins NOD i rates BB demostren també el paper crític que juguen les cèl·lules T en la patogènesi de la diabetis autoimmune. S'ha demostrat que ratolins NOD atímics no desenvolupen ni insulitis ni diabetis (Noorchashm, 1997). A més el tractament de ratolins amb anticossos anti-CD3 inhibeix totalment el desenvolupament de diabetis (Ogawa, 1985; Makino, 1986). Estudis amb ratolins NOD han demostrat que per transferir diabetis es requereixen tant limfòcits CD4⁺ (Th, cèl·lules col·laboradores, de l'anglès "helper"), com limfòcits T CD8⁺ (Tc, cèl·lules citotòxiques) (Christianson, 1993). El paper individual i

combinat d'aquestes cèl·lules en el desenvolupament de la diabetis, ha estat àmpliament estudiat. Se sap que les cèl·lules CD8⁺ poden produir efectes citotòxics directament sobre la cèl·lula β provocant la seva mort via perforina i granzim (Kagi, 1997). S'ha demostrat que aquesta resposta citotòxica és bloquejada amb anticossos anti-MHC-I, això indica que aquest efecte només està restringit a les cèl·lules de l'illot que expressin MHC de classe I. Pel contrari, estudis *in vitro* demostren que cèl·lules CD4⁺ soles no són capaces de destruir les cèl·lules β . Així doncs, les cèl·lules Th i Tc actuen de forma diferent durant la destrucció de la cèl·lula β .

Les citoquines produïdes per les cèl·lules Th juguen un paper important en la patogènesi de la diabetis. S'ha demostrat que les citoquines produïdes per les cèl·lules Th1, l'IL-2, l'IFN- γ i TNF β , estan involucrades en el desenvolupament de la malaltia i donarien màxima activitat a les cèl·lules CD8⁺. En canvi, les citoquines produïdes per les cèl·lules Th2 i Th3, l'IL-4, l'IL-10 i TGF- β han estat involucrades en la prevenció de la diabetis (Yoon, 2002).

Les cèl·lules CD8⁺ tot i tenir un efecte citotòxic directe sobre les cèl·lules β , també produeixen diferents citoquines inflammatòries, com TNF β , TNF α i IFN γ , que estimulen la sobreexpressió de Fas dins l'illot. Similarment, les cèl·lules CD4⁺ també poden estimular la producció de Fas, que en resposta a la unió al seu lligant FasL expressat tant en les cèl·lules CD4⁺ Th1 i CD8⁺, pot induir apoptosi i destruir les cèl·lules β . El sistema Fas, també conegut com APO-1 o CD95, constitueix una de les vies més importants d'inducció de mort cel·lular programada o apoptosi.

Així doncs, ambdós tipus cel·lulars, CD8⁺ i CD4⁺, juguen un paper principal com a efectors finals en la destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques (Figura 3) (Kim, 2002).

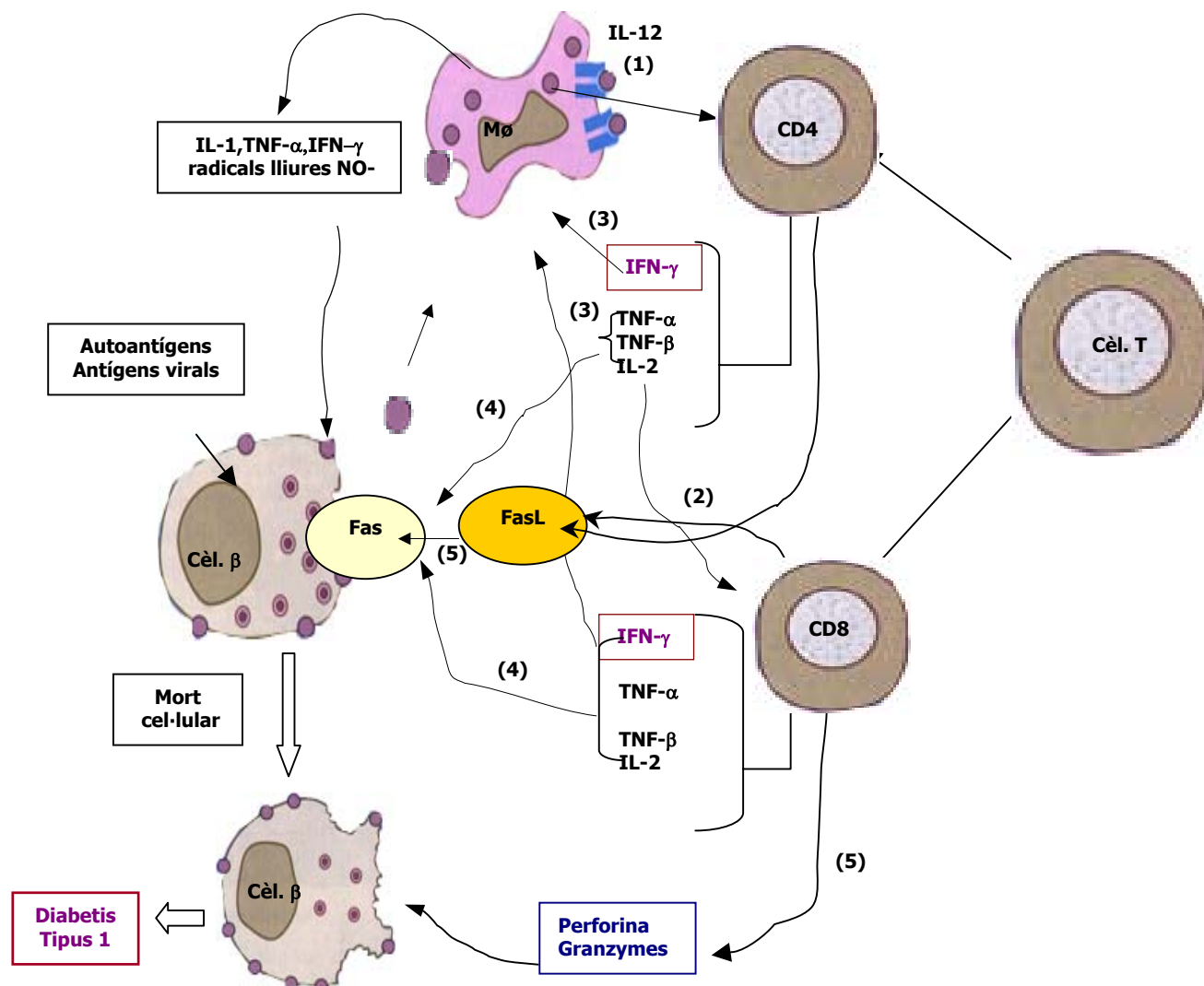


Figura 3. Representació esquemàtica de la col·laboració entre macròfags i cèl·lules T en la destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques. Els autoantígens presents en la cèl·lula β poden ser secretats i processats pels macròfags. Aquests els presenten a les cèl·lules T col·laboradores mitjançant molècules de MHC-II. Els macròfags activats poden secretar IL-12 la qual activa cèl·lules Th1 (CD4⁺) (1). Les cèl·lules CD4⁺ secreten citoquines tals com: IFN-γ, TNF-α, TNF-β i IL-2. Mentre aquest procés té lloc, cèl·lules T precitotòxiques específiques de cèl·lula β poden reclutar-se al voltant de l'illot. Aquestes poden activar-se induïdes per IL-2 i altres citoquines produïdes per les cèl·lules T CD4⁺ i diferenciar-se a cèl·lules T CD8⁺ (2). L'IFN-γ produït per les cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺ pot induir citotoxicitat en els macròfags (3). Els macròfags citotòxics poden secretar citoquines tòxiques com IL-1β, TNF-α i IFN-γ, també poden produir radicals lliures com H₂O₂ i NO. A més, les citoquines tòxiques dels macròfags poden induir l'expressió de Fas en la superfície de la cèl·lula β (4). Les cèl·lules β són destruïdes per apoptosi mitjançada per Fas (4) i/o per granzim i perforina, els quals són tòxiques per la cèl·lula (5).

3.2.2. Resposta humoral.

3.2.2.1. Paper de les citoquines.

Les citoquines són molècules sintetitzades i secretades per cèl·lules del sistema immune, macròfags i limfòcits, o per cèl·lules no immunitàries, fibroblasts, cèl·lules epitel·lials i queratinòcits. Les citoquines són majoritàriament utilitzades pel sistema immune per comunicar-se de forma local o sistèmica durant una resposta immune o inflamatòria. Existeixen més de 30 citoquines diferents i generalment s'agrupen com: interleukines (ILs), interferons (IFNs), factors de la neurosi tumoral (TNFs) i factors estimuladors de colònia (CSFs). A més a més, aquestes molècules poden actuar de forma autocrina, paracrina i endocrina.

Nombrosos estudis des de la dècada dels 90, relacionen les citoquines i la diabetis autoimmune. Estudis *in vitro* demostren que certes citoquines (IL-1, TNF- α , TNF- β , IFN- γ) poden ser directament citotòxiques per les cèl·lules β , inhibint la secreció d'insulina, i combinades poden destruir les cèl·lules β de l'illot (Rabinovitch, 1994). D'altra banda, en altres estudis s'ha observat com l'IFN- β , IFN- α i IFN- γ , indueixen l'expressió de molècules MHC a cèl·lules d'illots pancreàtics, després de 24-48 hores d'incubació amb aquestes molècules (Pujol-Borrell, 1986).

El mecanisme pel qual les citoquines indueixen diabetis tipus 1 no és encara del tot clar. No obstant, cada cop sembla més evident que quan els leucòcits de l'infiltrat presents en els illots produeixen nivells de citoquines tipus 1 (IFN- γ , IL-2 i TNF β) per sobre dels nivells de citoquines tipus 2 (IL-4 i IL-10) es produeix la destrucció selectiva de les cèl·lules β . Pel contrari, si el nivell de citoquines tipus 2 dominen en l'infiltrat per sobre del de les tipus 1, la insulitis és benigne i s'evita la destrucció de les cèl·lules β . Així doncs, el desenvolupament de diabetis és una qüestió d'equilibri entre les citoquines Th1 i Th2 (Rabinovitch, 1998).

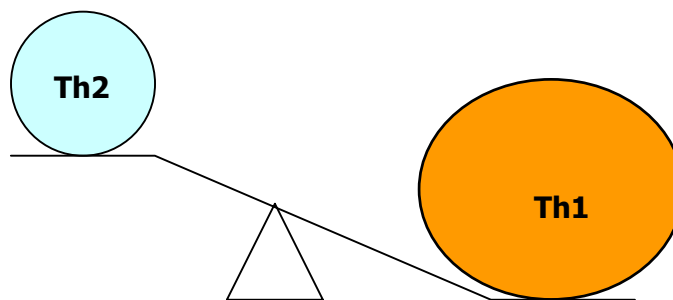


Figura 4. El balanç entre les citoquines Th1 i Th2 determinarà l'evolució d'una insulinitis benigna o destructiva.

Estudis amb animals transgènics han aportat gran quantitat d'informació sobre la possible implicació de diferents citoquines en el desenvolupament de la diabetis tipus 1. Animals transgènics que expressen IFN- γ en les cèl·lules β , presenten una severa infiltració dins els illots (insulinitis), destrucció de les cèl·lules β i desenvolupen diabetis autoimmune (Sarvetnick, 1988; Sarvetnick, 1990). L'expressió transgènica de IFN- α indueix també diabetis tipus 1 per inducció de molècules coestimuladores com B7-2 i ICAM-1 sobre els limfòcits infiltrats en l'illot (Stewart, 1993). A més, en el nostre laboratori hem demostrat que animals transgènics que expressen IFN- β exclusivament en la cèl·lula β , presenten alteració en l'expressió i secreció d'insulina, un augment dels nivells d'expressió de MHC-I, i els fa més susceptibles a desenvolupar diabetis (Pelegri, 1998).

Per contra, altres estudis demostren el paper protector de citoquines, com la IL-4 i la IL-10. En aquest cas la seva administració prevé el desenvolupament de diabetis en animals genèticament susceptibles a desenvolupar la malaltia, com els ratolins NOD i rates BB (Serreze, 1989; Zielasek, 1990; Rapaport, 1993; Pennline, 1994; Yang, 2002).

Per tant, tots aquests estudis indiquen que la insulinitis destructora de les cèl·lules β està associada a citoquines proinflamatories (IL-1, TNF α , IL-12 i IFN- α) i a citoquines Th1 (IFN- γ , TNF β i IL-2). Mentre que la insulinitis benigna està associada amb un increment de l'expressió de citoquines Th2 (IL-4 i IL-10) i TGF β .

3.2.2.2. Paper dels autoantígens.

S'ha observat que cèl·lules T CD4⁺ de pacients pre-diabètics proliferen en resposta a autoantígens de l'illot. Però el paper precís d'aquests autoantígens en el desenvolupament de la diabetis tipus 1 no és gens clar. Hi ha estudis que demostren la presència de cèl·lules T CD4⁺ Th1 reactivas contra l'autoantigen GAD en ratolins NOD. Aquests resultats demostrarien el paper clau d'aquest autoantigen en la diabetis autoimmunitària d'aquests ratolins (Zekzer, 1998). A més, la sobreexpressió de GAD65 sota el promotor de MHC-I en ratolins NOD accelera l'inici i l'incidència de diabetis en aquests animals (Geng, 1998). També, en ratolins NOD s'han trobat clons de cèl·lules T CD8⁺ i cèl·lules T CD4⁺ reactivas contra aminoàcids de la cadena B de la insulina (Daniel, 1994; Wong, 1999).

3.3. MODELS ANIMALS DE DIABETIS TIPUS 1.

La patogènesi de la diabetis tipus 1 roman amagada durant un llarg procés autoimmunitària que dura mesos o anys abans de manifestar-se la malaltia. Això en dificulta molt l'estudi directe d'aquesta patologia. Per tant, la utilització de models animals per a l'estudi de la diabetis ha estat decisiva per poder examinar els mecanismes involucrats. Dels diversos models animals utilitzats, han estat de particular importància els models de diabetis experimental provocada per l'administració de tòxics selectius per les cèl·lules β , juntament amb l'estudi de soques d'animals que desenvolupen espontàniament diabetis. Durant la última dècada, la utilització d'animals transgènics ha obert un nou camí en l'estudi de la diabetis.

3.3.1. Models murins amb diabetis espontània.

3.3.1.1. La rata BB (*BioBreeding Worcester*).

Un model animal de diabetis tipus 1 espontània similar a la que presenten els humans és la rata BB (*BioBreeding Worcester*). Les rates BB van ésser descobertes els anys 70 a Ottawa (*BioBreeding Laboratories Ltd*). Aquestes rates presenten una predisposició genètica i un llarg període pre-diabètic que precedeix a la hiperglicèmia.

La incidència de la diabetis en aquest model és independent del sexe i és variable segons les colònies. Així, s'han obtingut dues colònies diferents, una colònia BBDR (diabetis-resistent) en la que només l'1% dels individus desenvolupa diabetis, i una colònia susceptible BBDP (diabetis-prone) en la que el 90% dels individus presenten els primers símptomes als 3

mesos d'edat. Aquests animals es caracteritzen per presentar hipoinsulinèmia, hiperglicèmia, glucosúria, poliúria i pèrdua de pes. També hi ha presència d'insulitis en els pàncrees d'aquests animals similar a la que presenten els humans, on s'hi detecten cèl·lules T citotòxiques i col·laboradores, amb macròfags, cèl·lules NK i cèl·lules B. Aquesta colònia BBDP també es caracteritza per una marcada limfopènia de cèl·lules T (Mordes, 2001). Aquesta limfopènia perifèrica que presenten les rates BBDP, representa la falta primària de cèl·lules T que expressin ART2, anomenada també RT6 (Bortell, 1999). L'ART2 és un marcador de cèl·lules T amb capacitat reguladora. La transfusió de cèl·lules T ART2⁺ prevé el desenvolupament de diabetis i només les cèl·lules ART2⁻ són capaces de transferir diabetis a individus sans (Burstein, 1989; Whalen, 1994). La diabetis en aquest model està també relacionada amb els MHC de classe II, i s'han descrit loci diferents, *iddm2*, *lyp/iddm1* i *iddm4*, que donarien susceptibilitat a desenvolupar diabetis (Greiner, 2001). Aquests animals requereixen l'administració d'insulina exògena per a la seva supervivència, això limita molt el seu manteniment, estabulació, reproducció i manipulació.

3.3.1.2. Ratolins NOD (non-obese diabetic).

Els ratolins NOD deriven d'una sublínia de ratolins Jc1-ICR que van ser descoberts l'any 1974 en els laboratoris Shinogi Research d'Osaka. Aquesta línia exhibeix una síndrome diabètica molt similar a la diabetis tipus 1 humana. Els símptomes apareixen aproximadament a les 12-14 setmanes i són: hipoinsulinèmia, hiperglicèmia i glucosúria. Al voltant de les 5 setmanes d'edat aproximadament ja presenten insulitis (Makino, 1980). Similar als infiltrats dels pacients humans, en aquests infiltrats s'hi poden detectar cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺, cèl·lules NK i macròfags.

Aquests ratolins expressen una molècula del complex major de histocompatibilitat classe II (MHC-II), I-A^{g7} que els fa susceptibles a desenvolupar diabetis, la qual és estructuralment i funcionalment homòloga a la molècula HLA-DQ8, associada a susceptibilitat de desenvolupar diabetis en humans. A més a més, es poden detectar autoantígens com GAD i IA-2 en els pàncrees d'aquests animals (Adorini, 2002).

Probablement sigui el millor model animal de diabetis espontània. Però només desenvolupen diabetis oberta el 80% de les femelles i el 20% dels mascles (Makino, 1980). A més la incidència de diabetis en els ratolins NOD és variable, donat que és sensible a les condicions ambientals i responen a immunomanipulació. Aquests animals requereixen l'administració

d'insulina exògena per a la seva supervivència, això limita molt el seu manteniment, reproducció i manipulació. A més, es tracta d'una línia consanguínia i la població humana és totalment heterogènia (Adorini, 2002).

Actualment, ha augmentat la informació sobre la patogènesi de la diabetis aportada per aquest model. L'expressió de diferents transgens en els ratolins NOD, especialment en les cèl·lules β sota el control del promotor de la insulina de rata (RIP) hi ha tingut un paper clau (Kay, 2000).

3.3.2. Animals transgènics models de Diabetis Tipus 1.

La generació d'animals transgènics ha permès estudiar les propietats diabetogèniques de moltes molècules, donat que aquestes molècules poden expressar-se exclusivament en les cèl·lules β gràcies a promotors específics. Els transgens expressats en la cèl·lula β inclouen des de antígens MHC, citoquines, proteïnes virals i autoantígens.

3.3.2.1. Animals transgènics que expressen antígens MHC.

S'han generat diversos transgènics amb l'objectiu d'induir l'expressió de molècules de MHC de classe II en les cèl·lules β i determinar-ne el seu paper en el desenvolupament de la diabetis. Un dels primers estudis va demostrar que l'expressió completa de l'antigen IA (molècula homòloga a MHC de classe II) podia induir diabetis (Sarvetnick, 1988). Curiosament, Lo *et al.* amb un estudi molt similar, expressant la molècula IE (també homòloga a MHC classe II) observava que els animals transgènics desenvolupaven diabetis, però no s'observava cap infiltrat limfocitari ni cap evidència de resposta immunològica (Lo, 1988). En estudis posteriors s'ha demostrat la importància dels nivells d'expressió d'aquestes molècules per induir diabetis, probablement un nivell crític d'expressió seria necessari perquè es donés l'aparició de la malaltia (Allison, 1990).

També, s'han generat models transgènics que expressen molècules de MHC de classe I en les cèl·lules β . J. Allison *et al.* l'any 1988 van obtenir un animal transgènic que sobreexpressava el gen d'histocompatibilitat de classe 1, H-2Kb, en les cèl·lules β sota el control del promotor del gen de la insulina de rata. El transgèn es va introduir en diferents soques i en la majoria d'elles un elevat percentatge dels animals desenvolupaven diabetis. En aquest cas, tampoc es va observar cap infiltrat limfocitari ni cap senyal de reacció autoimmune (Allison, 1988).

3.3.2.2. Animals transgènics que expressen citoquines.

L'any 1990, N. Sarvetnick *et al.* van generar un animal transgènic que expressava IFN- γ en les cèl·lules β pancreàtiques sota el control del promotor del gen de la insulina de rata (RIP). Els animals transgènics obtinguts desenvolupen diabetis com a resultat d'una progressiva destrucció dels illots pancreàtics, causada per la infiltració limfocitària. A més a més, s'observa expressió ectòpica de les molècules de MHC classe II (Sarvetnick, 1990).

L'expressió transgènica de l'IL-2 en les cèl·lules β causa una extensiva peri-infiltració en els illots però sense dany autoimmune ni desenvolupament de diabetis (Allison, 1992). En canvi, quan es generen animals triple transgènics per l'IL-2, per l'antigen MHC classe I i pel receptor de la cèl·lula T, s'observa insulitis i s'accelera l'inici de la diabetis. Una possible explicació dels autors, és que l'IL-2 dirigiria l'activació i reclutament de les cèl·lules T autoreactives contra les cèl·lules β portadores dels antigens MHC de classe I (Heath, 1992).

L'expressió transgènica de TNF- α en les cèl·lules β provoca una severa inflamació, amb un infiltrat ric en cèl·lules B, cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺. També s'observa fibrosi en els illots i la formació de ductes dins de l'illot, fets que suggereixen una possible capacitat regenerativa. Però, tot i aquest fenotip, els ratolins transgènics no desenvolupen diabetis, demostrant així que la inflamació causada per l'expressió de TNF- α no és diabetogènica *per se* (Higuchi, 1992; Picarella, 1993).

L'any 1993, Stewart *et al.* van generar un ratolí transgènic que expressava IFN α exclusivament en les cèl·lules β pancreàtiques, el 5% dels individus desenvolupaven diabetis espontània quan eren congènics amb la soca C56Bl/6J (Stewart, 1993). Mentre que, el 50% dels individus congènics amb la línia CD1 mostraven diabetis hipoinsulinèmica acompanyada d'una inflamació centrada en els illots. Aquesta inflamació podia ser previnguda per l'administració d'anticossos neutralitzants contra l'IFN α .

L'IL-10 és una citoquina produïda per les cèl·lules Th2 amb capacitat immunosupressora, inhibint la producció de citoquines i la presentació d'antigens per part dels macròfags (Rabinovitch, 1994). La seva expressió en les cèl·lules β conjuntament amb el receptor del virus de la coriomeningitis limfocítica LCMV i després d'una infecció amb LCMV, no protegeix del desenvolupament accelerat de diabetis. Així, aquests resultats suggereixen que IL-10 no prevé la destrucció de les cèl·lules β mitjançada pel sistema immunitari (Lee, 1994).

La IL-12 és una citoquina produïda per cèl·lules Th1 i promou i regula tant la immunitat innata com l'adaptativa. També intercedeix en l'acció de les cèl·lules T en malalties autoimmunes com la diabetis tipus 1 (Adorini, 1999). L'expressió transgènica d'aquesta citoquina en les cèl·lules β pancreàtiques provoca una gran infiltració de cèl·lules mononuclears com macròfags, cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺. Però aquests ratolins no arriben a desenvolupar diabetis (Holz, 2001).

3.3.2.3. Animals transgènics que expressen antígens virals.

L'expressió d'antígens virals en la superfície de les cèl·lules β podria ésser un dels factors primaris en el procés de desenvolupament de la diabetis tipus 1. Per aquesta raó, diversos grups han generat ratolins transgènics amb l'expressió localitzada d'aquests antígens en la cèl·lula β .

L'expressió de l'antigen T del SV40 (un potent oncogèn viral) en la cèl·lula β , provoca hiperplàsia dels illots, tumors similars als insulinomes i en alguns casos pancreatitis, però mai diabetis. A més la resposta autoimmune només es dona quan l'expressió del transgèn té lloc als 2-3mesos, si l'expressió es dona durant la gestació es genera tolerància (Adams, 1987).

L'any 1990 Roman *et al.*, van generar un animal transgènic que expressava l'hemaglutinina del virus influenza en les cèl·lules β . Aquests animals mostraven infiltració limfocitària en els illots, destrucció de les cèl·lules productores d'insulina, autoanticossos i finalment desenvolupaven diabetis (Roman, 1990).

Els animals transgènics que expressaven el gen de la glucoproteïna (GP) o bé la nucleoproteïna (NP) del virus de la coriomeningitis limfocítica (LCMV) en les cèl·lules β , no desenvolupen diabetis. Però quan se'ls infecta amb virus LCMV, apareix una insulitis progressiva que porta a la destrucció selectiva de les cèl·lules β i finalment desenvolupen diabetis tipus 1 (Oldstone, 1991). A més, quan els ratolins transgènics GP del LCMV s'encreuen amb ratolins transgènics TCR específic pel virus LCMV no desenvolupen diabetis si no són infectats pel LCMV. Això indica que les cèl·lules T autoreactives romanen inactives fins que arriba l'estímul apropiat (Ohashi, 1991).

3.3.3. Models de diabetis experimental.

Existeixen diversos agents químics amb propietats diabetogèniques. Principalment s'han descrit l'estreptozotocina (STZ) i l'al·loxan. Ambdós tòxics són específics de la cèl·lula β . La seva efectivitat com agents diabetogènics depèn en gran part de l'edat, sexe i espècie a la qual s'injecta. Aquests agents han permès estudiar detalladament els successos bioquímics, hormonals i morfològics que tenen lloc durant i després de la inducció de l'estat diabètic.

3.3.3.1. Diabetis induïda per STZ.

La STZ, 2-deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosourea)-1-Dlucopyranose, és un antibiòtic que inicialment s'aïllava de cultius de *Streptomyces achromogenes*. L'efecte diabetogènic d'aquest antibiòtic es va descriure per primera vegada pels laboratoris Upjohn. La STZ entraria dins la cèl·lula β probablement pel transportador de glucosa GLUT2, d'aquesta manera només afectaria a aquestes cèl·lules de l'illot (Schnedl, 1994). El mecanisme de toxicitat que provoca la mort de la cèl·lula β inclou tres fenòmens: (1) processos de metilació, (2) generació de radicals lliures, i (3) producció d'òxid nítric (NO). Un dels efectes deleteris de la STZ resulta de la formació de ions CH_3^+ per la descomposició del grup nitrós de la droga. Se sap que la generació de ions CH_3^+ a l'interior cel·lular provoca l'alquilació del DNA i com a conseqüència s'activen els mecanismes reparadors de la cèl·lula, en concret l'enzim poly (ADP-ribosa) sintasa. L'activació d'aquest enzim provoca un exhauriment de les reserves de NAD^+ amb la subseqüent cessació del metabolisme proteic depenent d'aquest metabòlit i per últim la mort de la cèl·lula (Wilson, 1984).

S'ha observat, tant en estudis *in vivo* com *in vitro*, que la formació de radicals lliures per la peroxidasa d'hidrogen pot ser estimulada per la STZ. A més, la STZ podria inhibir l'enzim superòxid dismutasa, un important recol·lector (de l'anglès scavenger) dels radicals lliures. La STZ podria generar a l'interior de la cèl·lula productes com el superòxid que poden generar NO i radicals hidroxils que provocarien dany en el DNA i la inducció d'apoptosi (Bedoya, 1996).

Una única injecció de STZ a dosis elevades (160-200 mg/kg de pes viu) a ratolins és suficient per causar la necrosi de la cèl·lula β i la posterior hiperglicèmia. Per contra, si el tòxic s'administra en múltiples petites dosis (40 mg/Kg de pes viu) durant 5 dies consecutius, que cadascuna per separat no seria diabetogènica, es produeix una infiltració pancreàtica (insulitis) que destrueix la cèl·lula β i causa una severa diabetis en individus susceptibles.

Aquest mètode d'administració constitueix l'anomenat model "*multiple low dose streptozotocin*" (MLDSTZ). Aquest mètode, proporciona un model experimental per a l'anàlisi del paper de la insulinitis en la destrucció de la cèl·lula β (Rossini, 1977). A més a més, suggereix que un procés immune mediat per cèl·lules pot ser un dels factors claus en aquesta varietat de diabetis tòxica.

Quan s'administren MLDSTZ de STZ (40 mg/kg de pes) a mascles de la soca CD-1, als 7 dies ja es manifesta una severa intolerància a la glucosa, i als 31 dies, s'ha produït una marcada diabetis. Tot i que cal tenir en compte que l'efecte de la droga varia segons l'edat, el sexe i la soca a què s'administra. Així la soca CD-1 és més susceptible que la soca C57Bl/6J que és resistent a desenvolupar insulinitis a la dosi descrita (Rossini, 1977). Altres soques com la C57Bl/KsJ exhibeix una elevada sensibilitat a la inducció d'insulinitis i d'hiperglicèmia semblant a l'observada en els mascles CD1. Tanmateix, altres soques com les A/J, BALB/cJ, CBA/J, C3H/HeJ i DBA/2J, presenten diversos graus de susceptibilitat al tractament per MLDSTZ comparat amb la soca C57Bl/KsJ (Rossini, 1977). Així doncs, en el model MLDSTZ la soca CD-1 és una de les més sensibles i en concret els mascles d'aquesta soca mostren més susceptibilitat.

Hi ha diversos estudis que relacionen l'efecte de la STZ amb la inducció d'insulinitis i el procés diabètic. Així s'ha observat que animals tractats amb MLDSTZ presenten una inducció de l'expressió dels antígens MHC a diversos teixits (ronyó, fetge, cor i pàncrees). En aquest procés s'hi han vist implicats també citoquines com l'IFN γ , alliberat per les cèl·lules Th1 (Cockfield, 1989), i com l'IFN α que s'ha descrit la seva participació en el desenvolupament del procés diabètic induït per MLDSTZ (Huang, 1994). Altres estudis demostren la presència d'un gran nombre de cèl·lules T (CD4 $^+$ i CD8 $^+$) en els infiltrats després del tractament amb MLDSTZ (Herold, 1987; Kantwerk, 1987). També, abans de l'inici de la insulinitis i la diabetis hi ha presència de macròfags en els illots i que aquests juguen un paper important en l'inici de la diabetis induïda per MLDSTZ (Kolb-Bachofe, 1988). Aquests macròfags activats poden produir radicals lliures i citoquines com IL-1 i TNF que poden amplificar el dany sobre la cèl·lula β (Mandrup-Poulsen, 1990).

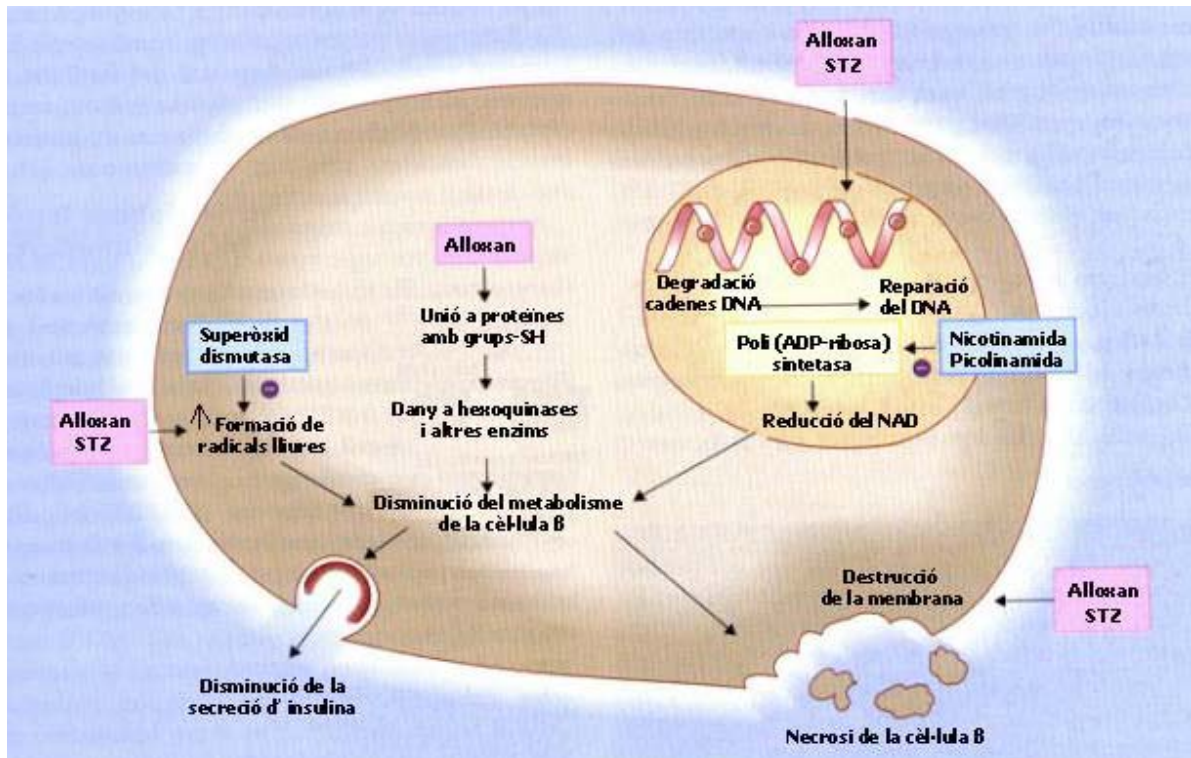


Figura 5. Esquema de l'efecte tòxic de la STZ i l'Alloxan sobre les cèl·lules β pancreàtiques. Inhibidors de la poly(ADP-ribose) sintetasa tals com la nicotinamida i la superòxid dismutasa, recol·lectors de radicals lliures, poden protegir contra l'efecte diabetogènic d'aquests tòxics. L'administració de múltiples baixes dosis de STZ pot induir l'atac autoimmune contra la cèl·lula β. (Sandler S, Abstracts of Uppsala Disertstions from Faculty of Medecine, University of Uppsala, Sweden, 1983; Pickup,1997)