

4. INTERFERONS.

Els interferons (IFN) van ser descoberts a finals dels anys 50 en cèl·lules infectades pel virus de *l'influenza*, aquestes proteïnes són les responsables del fenomen d'interferència viral (Isaacs, 1987), i per tant confereixen la primera línia de defensa contra infeccions per virus. Els IFNs són citoquines amb un efecte pleiotròpic, poden modular el sistema immune de diverses maneres i poden també afectar la proliferació i diferenciació cel·lular (Kunzi, 2000). Els interferons es poden classificar com a citoquines, ja que són molècules similars a hormones secretades per diversos tipus cel·lulars. Exerceixen les seves accions en cèl·lules diana via receptors específics de la superfície cel·lular.

4.1. CLASSIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DELS INTERFERONS.

Els interferons es classifiquen en dues subfamílies, interferons tipus I que inclou l'IFN α , l'IFN β , IFN ω i IFN τ , i la subfamília d'interferons de tipus II que només inclou l'IFN γ . Els interferons de tipus I comparteixen característiques estructurals i funcionals com el seu receptor que és diferent al receptor de l'interferó γ . Els interferons α , β i ω estarien més capacitats per induir resistència vírica a les cèl·lules. En canvi, l'IFN γ tindria un paper més important en la regulació de la resposta del sistema immunitari.

Els gens que codifiquen pels interferons de tipus I humans es troben localitzats en el braç curt del cromosoma 9 dins d'una regió de 400 kb (Kunzi, 2000). Hi ha com a mínim 23 gens diferents d'IFN α que codifiquen per 15 proteïnes funcionals. En canvi només hi ha un únic gen que codifiqui per l'IFN β . Cap d'aquests gens presenten introns. D'altra banda, l'IFN γ està codificat per un sol gen localitzat al cromosoma 12 i conté tres introns.

Taula 1. Classificació i caracterització dels interferons.

	IFNα/β superfamília (tipus I)	IFNγ (tipus II)
Subfamílies	IFN α (12 gens funcionals en humans) IFN β IFN ω IFN τ (només en rumiants)	No
Gens	Cromosoma 9 (humans)	Cromosoma 12 (humans)
Estructurals	Cromosoma 4 (ratolins)	Cromosoma 10 (ratolins)
Introns	No	3
Proteïnes	IFN α : 165-166aa IFN β : 166aa IFN ω : 172aa IFN τ : 172aa	143 aa (formant dímers)
Receptors	Heterodímer IFNAR1/ IFNAR2	Heterodímer IFNGR1/IFNGR2
(Vilcek, 2000)		

4.2. MECANISMES D'ACCIÓ I ACCIONS BIOLÒGIQUES DELS INTERFERONS.

Els IFNs tipus I, l'IFN α i IFN β , tenen el receptor comú i és present en humans (Branca, 1981) i en ratolí (Aguet, 1980). Els receptors heterodimèrics de IFN α / β i IFN γ (Taula 1) pertanyen a la mateixa família de receptors de citoquines classe II, que inclou els receptors de IL-10R i TF (Tissue Factor) (Vilcek , 2000).

El gen del receptor d'IFN α / β es troba en el cromosoma 21 i té una mida de 120 KDa. Està present pràcticament en tots els tipus cel·lulars, de la mateixa manera que quasi totes les cèl·lules poden expressar interferons de tipus I en resposta a infecció vírica, almenys en mamífers.

Els receptors de $\text{IFN}\alpha/\beta$ i $\text{IFN}\gamma$ utilitzen membres de la família Janus quinases (JAKs), situats en el citoplasma, per activar transductors de la senyal i activar factors de transcripció com STATs (Stark, 1998). Aquests migraran cap al nucli on induiran l'expressió de gens. En general la transmissió de la senyal dels IFNs involucra: (a) unió de l'IFN amb les 2 subunitats del receptor, (b) activació de 2 membres de les JAK tirosina quinases (JAK1 i TYK2 per $\text{IFN}\alpha/\beta$; JAK1 i JAK2 per $\text{IFN}\gamma$), provocant la fosforilació dels STATs (STAT1 i STAT2 per $\text{IFN}\alpha/\beta$; STAT1 per $\text{IFN}\gamma$), (c) la homo o heterodimerització dels STATs fosforilats, els activa per (d) transportar-se al nucli, i (e) STAT s'uneix a seqüències del DNA específiques induint-ne la transcripció (Stark, 1998).

Diverses proteïnes codificades pels gens estimulats per interferons (ISGs), la quinasa PKR i les proteïnes Mx, tenen un efecte directe antivíric (Kunzi, 2000; Jensen, 2002). La seva activitat antiviral està estimulada pels interferons de tipus I i mitjançada per la interacció sinèrgica o antagònica amb citoquines inflammatòries. Així l' $\text{IFN}\alpha$ i l' $\text{IFN}\beta$ estimulen l'expressió d'antígens MHC de classe I, i en macròfags de ratolins bloquegen la inducció d'antígens MHC-II per $\text{IFN}\gamma$ (Kunzi, 2000). L' $\text{IFN}\alpha$ pot estimular la producció de cèl·lules Th1 que secreten IL-2 i $\text{IFN}\gamma$ (Kunzi, 2000). També s'ha observat que els IFNs tipus I poden potenciar l'expansió clonal de les cèl·lules T CD8^+ (Tough, 1996). Independentment dels seus efectes antivírics, els IFNs tipus I tenen efectes antiproliferatius sobre moltes cèl·lules. Així, els $\text{IFN}\alpha/\beta$ poden allargar totes les fases del cicle cel·lular, sense afectar la ratio de DNA, RNA o síntesi de proteïnes, i poden bloquejar els factors d'inducció a l'entrada de la fase S. Hi ha evidències clares que tant l' $\text{IFN}\alpha$ com l' $\text{IFN}\beta$ tenen un paper clau en l'apoptosi de cèl·lules infectades per virus com en cèl·lules tumorals (Kunzi, 2000). D'altra banda, s'ha observat que $\text{IFN}\alpha/\beta$ eviten l'activació de la mort de les cèl·lules T durant una infecció (Marrack, 1999).

Diversos estudis amb pacients diabètics humans relacionen els interferons i l'etiologia de la diabetis. S'ha detectat la presència d' $\text{IFN}\alpha$ en illots de pacients humans (Foulis, 1987; Huang, 1995). També, s'ha trobat expressió d' $\text{IFN}\beta$ en illots de pacients humans (Somoza, 1994). L'expressió d' $\text{IFN}\alpha$ per les cèl·lules β pot ser provocada per una infecció viral o per algun altre tipus d'estrés. A més, l' $\text{IFN}\alpha$ podria activar a cèl·lules T autoreactives (Stewart, 1993; Chakrabarti, 1996). També, s'ha detectat la presència d' $\text{IFN}\gamma$ en illots de pacients diabètics (Foulis, 1991). L' $\text{IFN}\gamma$ produït per les cèl·lules T que infiltrin els illots humans, i possiblement conjuntament amb l'IL-1 i $\text{TNF}\alpha$ produïdes pels macròfags, poden tenir un efecte citotòxic directe sobre la cèl·lula β (Rabinovitch, 1998).

En la Taula 2 s'hi resumeixen les activitats biològiques dels IFNs de tipus I, determinades *in vitro*.

Taula 2. Activitats biològiques dels IFNs tipus I *in vitro* .

Efectes	Mecanismes
Efecte antivíric	Disminució de l'expressió de receptors virals Transcripció de proteïnes Mx Traducció de vies PKR i gens ISG Empaquetament de virus: retrovirus, <i>HIV</i>
Inhibició del creixement cel.lular	Modulant el cycle cel.lular Antagonisme dels factors de creixement
Inducció d'apoptosi	Inducció de gens proapoptòtics: IRF-1 PKR RNaseL
Modulació funció hematopoiètica	Inhibició proliferació i diferenciació de monòcits Supressió progenitors dels eritròcits
Modulació d'antígens MHC	Disminució de l'expressió MHC-II en macròfags Estimulació de la transcripció de MHC-I
Activació de macròfags	Activació de l'activitat citolítica
(Kunzi <i>et al.</i> , 2000)	

4.3. ANIMALS TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN IFN β EN LES CÈL·LULES β PANCREÀTIQUES.

Un nombre important de citoquines poden alterar la funcionalitat de les cèl·lules β i per tant poden estar involucrades en el desenvolupament de la diabetis tipus 1. L'expressió d'IFN β és induïda en cèl·lules epitelials per la infecció de diferents virus, i s'ha detectat la seva expressió en pacients diabètics tipus 1 (Somoza, 1994). El tractament *in vitro* d'illots aïllats de ratolins amb aquesta citoquina altera notablement la secreció d'insulina (Pelegri, 1998). Per tal d'estudiar el paper de l'IFN β *in vivo* sobre l'alteració de la funcionalitat de la cèl·lula β

i la possible inducció de diabetis, en el nostre laboratori es van generar ratolins transgènics (C57Bl6/sJL) que expressen IFN β humà en les cèl·lules β . Aquests animals mostren alteració funcional dels illots i la secreció d'insulina estimulada per glucosa està alterada. A la vegada, aquests ratolins presenten una lleugera hiperglicèmia, hipoinsulinèmia, hipertriglicèridèmia i també mostren el test de tolerància a la glucosa alterat. Totes aquestes característiques, són típiques d'un estat prediabètic (Beer, 1990). A més, aquests animals desenvolupen diabetis oberta amb infiltració limfocitària en els illots, després del tractament amb múltiples dosis d'estreptozotocina (40 mg/kg). Quan els ratolins transgènics s'encreuen amb una soca més susceptible a desenvolupar diabetis, com la CD-1, un 9% dels ratolins obtinguts al cap de 3 generacions presenta diabetis espontània. Aquests animals mostren una marcada hiperglicèmia, hipoinsulinèmia i infiltració dels illots per cèl·lules mononuclears (Pelegri, 1998).

Tots aquests resultats suggereixen que l'IFN β combinat amb altres factors com el fons genètic, podria estar involucrat en el desenvolupament de la diabetis tipus 1. Amb l'interès de continuar estudiant aquest model i caracteritzar amb més profunditat el paper d'IFN β en l'inducció de l'atac immunitari contra la cèl·lula β , es van continuar creuant aquests animals fins a 10 generacions amb la soca CD1. El treball experimental que presentem és la continuació d'aquest estudi previ.

5. FACTOR DE CREIXEMENT SIMILAR A LA INSULINA TIPUS I (IGF-I).

5.1. ESTRUCTURA DE L'IGF-I.

El factor de creixement similar a la insulina de tipus I (IGF-I) pertany a una família de pèptids relacionats amb la insulina entre els quals hi ha l'IGF-I i l'IGF-II. L'IGF-I està format per 70 aminoàcids i té un pes molecular de 7,6 KDa, mentre que IGF-II posseeix 63 residus i un pes molecular de 7,4 KDa (Van den Brande, 1990). Tots dos factors de creixement conserven molta homologia entre ells i amb la insulina. A l'estructura dels IGFs es poden reconèixer també els dominis A, B i C com en la proinsulina, però presenten, a més una extensió a l'extrem carboxiterminal, a continuació del domini A, anomenat domini D que no és present en la proinsulina (Daughaday, 1989). A diferència de la insulina que circula a concentracions de l'ordre de picomolar, l'IGF-I circula a concentracions de l'ordre de nanomolar i unit a proteïnes que en regulen l'activitat (IGFBPs) (Jones, 1995). El principal òrgan de producció d'IGF-I circulant, com de les seves proteïnes d'unió és el fetge, encara que pot ser sintetitzat en la majoria de teixits a on actua de forma autocrina o paracrina.

5.2. PAPER FISIOLÒGIC I MECANISME D'ACCIÓ.

Tant l'IGF-I com l'IGF-II són essencials en el desenvolupament embrionari (Baker, 1993). En humans, ambdós es mantenen en circulació durant la vida adulta, si bé es desconeix el paper fisiològic d'IGF-II després del naixement.

Donat que els IGFs tenen accions similars a la insulina, els primers estudis d'unió competitiva van demostrar que encara que tant l'IGF-I com l'IGF-II es poden unir al receptor de la insulina, aquesta unió és dèbil. Aquests factors posseeixen els seus propis receptors amb els que hi tenen elevada afinitat (Hintz, 1972; Zapf, 1978). El receptor tant de la insulina (IR) com el de l'IGF-I (IGF-IR) tenen una estructura similar amb quatre subunitats unides per ponts disulfur, aquests receptors s'anomenen tipus 1 (Massagué, 1982). El receptor IGF-IR té molta afinitat per l'IGF-I i una afinitat unes 10 vegades menor per l'IGF-II. La insulina és la que s'uneix més dèbilment a aquest receptor, amb el què hi té una afinitat unes 100 vegades menor que la que té per IGF-I. Les accions dels IGFs de tipus metabòlic i de control de proliferació i diferenciació, són mitjançades pels receptors IR i IGF-IR.

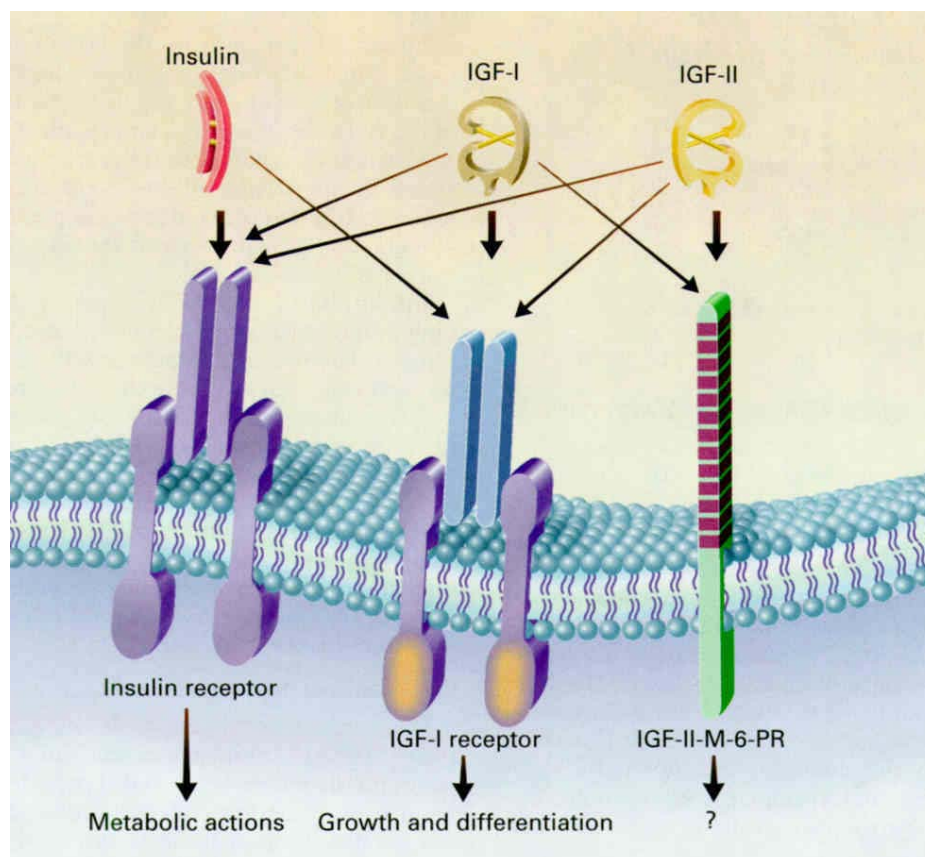


Figura 6. Esquema afinitat dels receptors de la insulina, de l'IGF-I i de l'IGF-II per les respectives hormones (Le Roith, 1997)

El mecanisme de transducció de senyal de l'IGF-I a través del seu receptor és molt similar al que utilitza la insulina a través del IR. En aquest procés hi estan implicats el substrat del receptor de la insulina (IRS-1) i la fosfatidilinositol 3-quinasa (Ruderman, 1990), p21^{ras} (Jhun, 1994), així com la Map2 quinasa i la S6 quinasa ribosomal que s'activen en resposta tant a la insulina com a IGF-I (Hoshi, 1988). La insulina està més involucrada en la regulació del metabolisme i l'IGF-I en el creixement i desenvolupament. Això pot ser degut a la diferent distribució cel·lular dels seus receptors, més que no pas al seu mecanisme d'acció. Tot i que molts teixits expressen ambdós receptors, teixits metabòlics com el fetge i el teixit adipós presenten un gran nombre de receptors per la insulina i molt pocs receptors de l'IGF-I. Per contra, els fibroblasts i les cèl·lules β del pàncrees contenen principalment receptors d'IGF-I (Flier, 1986).

Molts investigadors suggereixen que IGF-I té un paper important en el desenvolupament i creixement del pàncrees exocrí i endocrí. S'ha descrit que IGF-I estimula la diferenciació i proliferació de les cèl·lules β (Le Roith, 1997). Ratolins deficientes pel receptor d'IGF-I i pel gen d'IGF-I moren pocs minuts després del neixament, possiblement per una parada

respiratòria, i mostren una elevada hiperglicèmia (Liu, 1993). Actualment però, s'ha observat que animals deficients pel IGF-IR exclusivament en la cèl·lula β , no presenten disminució de la massa de cèl·lula β , presenten alteració de la secreció d'insulina en resposta a glucosa i arginina i són intolerants a la glucosa (Xuan, 2002; Kulkarni, 2002). D'altra banda, sembla que la capacitat proliferativa d'IGF-I en les cèl·lules β sembla tenir lloc a través de l'IRS-2 (Zhang, 1998; Hügl, 1998). Estudis *in vivo* demostren que el senyal a través del receptor d'IGF-I promou el desenvolupament i la proliferació de la cèl·lula β (Withers, 1999). Així, ratolins homozigots deficients per IRS-2 (Withers, 1999; Withers, 1998), ratolins deficients per IRS-1 (+/-) i IRS-2 (-/-) (Withers, 1999), i ratolins deficients per IGF-IR (+/-) i IRS-2 (-/-) (Withers, 1999) tots ells mostren una marcada reducció de la massa de cèl·lula β i moren degut a l'aparició de diabetis oberta. Similarment, mentre que ratolins que sobreexpressen la proteïna quinasa activada serina /threonina Akt1, un mediador de la via de senyalització d'IGF-I, presenten proliferació de la cèl·lula β i hiperplàsia (Tuttle, 2001), ratolins deficients en S6 quina ribosomal S6K1 (p70^{S6k}), un factor activat per Akt, presenten hipoinsulinèmia i una marcada disminució de la massa de cèl·lula β (Pende, 2000).

Altres estudis mostren l'increment en l'expressió d'IGF-I en les zones de regeneració de gossos i rates adultes sotmeses a pancreatectomia parcial, la qual cosa suggereix que IGF-I pot contribuir al creixement o diferenciació del teixit pancreàtic (Smith, 1991; Hayakawa, 1996). Així mateix, IGF-I podria induir la diferenciació de cèl·lules epitelials de conductes pancreàtics a cèl·lules β (Bonner-Weir, 1993).

El factor de creixement IGF-I a més de les seves accions diferenciadores i proliferatives, és també un potent factor antiapoptòtic i aquesta acció ha estat comprovada tan en estudis *in vitro* com *in vivo*. Així, s'ha demostrat que IGF-I protegeix els illots contra l'inhibició de la secreció de la insulina mitjançada per IL-1 β , l'estimulació de la formació de NO i la apoptosi (Mabley, 1997). En la inhibició de l'apoptosi en cèl·lules β pancreàtiques, l'IGF-I pot actuar a nivell de diverses vies d'activació. Se sap que té un efecte antiinflamatori i antiapoptòtic via el seu receptor (IGF-IR), PI3K (fosfatidil inositol 3 quinasa) i a través de la PKB (proteïna quinasa B/Akt), (Kauffmann-Zeh, 1997). A la vegada la PKB fosforila i inactiva a BAD (Datta, 1997), una proteïna pro-apoptòtica de la família de les proteïnes Bcl-2. El paper antiinflamatori i antiapoptòtic d'IGF-I en les cèl·lules β depèn de l'activació de la PI3K (Castrillo, 2000). Paral·lament, el receptor d'IGF-I activa altres vies alternatives de protecció que desenvolupen en la fosforilació de BAD, com en l'activació de la MAP quinasa o l'activació de Raf-1 i la seva translocació a la mitocòndria (Peruzzi, 1999). Així mateix, la

transferència genètica d'IGF-I mitjançant adenovirus a illots humans en cultiu evita la formació d'òxid nítric mitjançada per IL-1 β i l'apoptosi mitjançada per Fas (Giannoukakis, 2000).

5.3. ANIMALS TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN IGF-I EN CÈL·LULES β PANCREÀTIQUES.

Els pacients amb diabetis tipus 1 són diagnosticats després de perdre pràcticament tota la massa de cèl·lula β . La regeneració de les cèl·lules β des de precursors podria revertir aquesta malaltia. Però els factors capaços d'induir neogènesi i replicació de les cèl·lules β i a la vegada, prevenir la destrucció autoimmune romanen sense identificar.

En el nostre laboratori s'han generat animals transgènics que expressen IGF-I específicament a les cèl·lules β pancreàtiques. L'expressió local d'IGF-I (tant en fons genètic C57BL/6-SJL o CD-1) contraresta la citotoxicitat i la insulitis en ratolins tractats amb MLDSTZ (50 mg/Kg) (George, 2002). Els ratolins controls tractats amb STZ desenvolupen hiperglicèmia i hipoinsulinèmia, perden pes, i finalment moren. Al contrari, els ratolins transgènics en fons genètic C57BL/6-SJL mostren una lleugera hiperglicèmia al cap d'un mes de tractament, després normalitzen la seva glicèmia i sobreviuen. Quan es tracten amb STZ ratolins en fons genètic CD-1 tots desenvolupen hiperglicèmia, hipoinsulinèmia, polidipsia i polifàgia. Tot i que, els ratolins transgènics CD-1 normalitzen gradualment tots els paràmetres metabòlics i sobreviuen. Paral·lelament incrementa la massa de cèl·lula β , com a resultat de la neogènesi i replicació de la mateixa. Per tant, tots aquests resultats indiquen que l'expressió local d'IGF-I en les cèl·lules β regenera els illots pancreàtics i contraresta la diabetis tipus 1, suggerint que la transferència del gen d'IGF-I al pàncrees pot ésser una possible teràpia per aquesta malaltia (George, 2002).

III. OBJECTIUS

En el nostre laboratori s'havien generat animals transgènics que expressaven el gen de l'IFN β humà específicament en les cèl·lules β pancreàtiques (RIP/IFN β), aquests animals presentaven un estat pre-diabètic i una major sensibilitat al tractament amb estreptozotocina. En el present treball ens vàrem plantejar aprofundir en la caracterització d'aquest model i valorar el paper de l'IFN β com a mediador de la resposta autoimmune conjuntament amb l'efecte del tractament amb molt baixes dosis d'estreptozotocina (STZ), per tal d'estudiar el paper d'aquesta citoquina en la funcionalitat pancreàtica i la seva implicació en la instauració de la diabetis tipus 1. Això ens permetria obtenir un animal transgènic model de diabetis tipus 1. Aquest model podria ser útil per l'assaig de noves aproximacions terapèutiques per aquesta malaltia. En especial, ens vam proposar estudiar si l'expressió d'IGF-I en les cèl·lules β podria contrarestar o bé prevenir el desenvolupament de la diabetis autoimmune.

Els objectius concrets han estat:

- 1.** Estudi i caracterització dels ratolins transgènics RIP/hIFN β en fons genètic de la soca CD1.
 - 1.1.** Determinar la dosis mínima de STZ necessària per agreujar el procés autoimmune iniciat per l'expressió d'IFN β en les cèl·lules β dels ratolins transgènics RIP/IFN β .
 - 1.2.** Estudi i caracterització del desenvolupament de la diabetis en els animals transgènics després del tractament.
- 2.** Obtenció de ratolins dobles transgènics que sobreexpressin IFN β i IGF-I en les cèl·lules β pancreàtiques, mitjançant l'encreuament d'animals RIP/hIFN β i RIP/IGF-I.
 - 2.1.** Obtenció i caracterització dels ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I.
 - 2.2.** Estudi i caracterització de l'efecte de dosis baixes de STZ en els ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I .
 - 2.3.** Determinar el paper d'IGF-I en la protecció de la mort de les cèl·lules β en els ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I tractats amb STZ.

IV. RESULTATS

1. RATOLINS TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN IFN β EN LES CÈL·LULES β PANCREÀTIQUES.

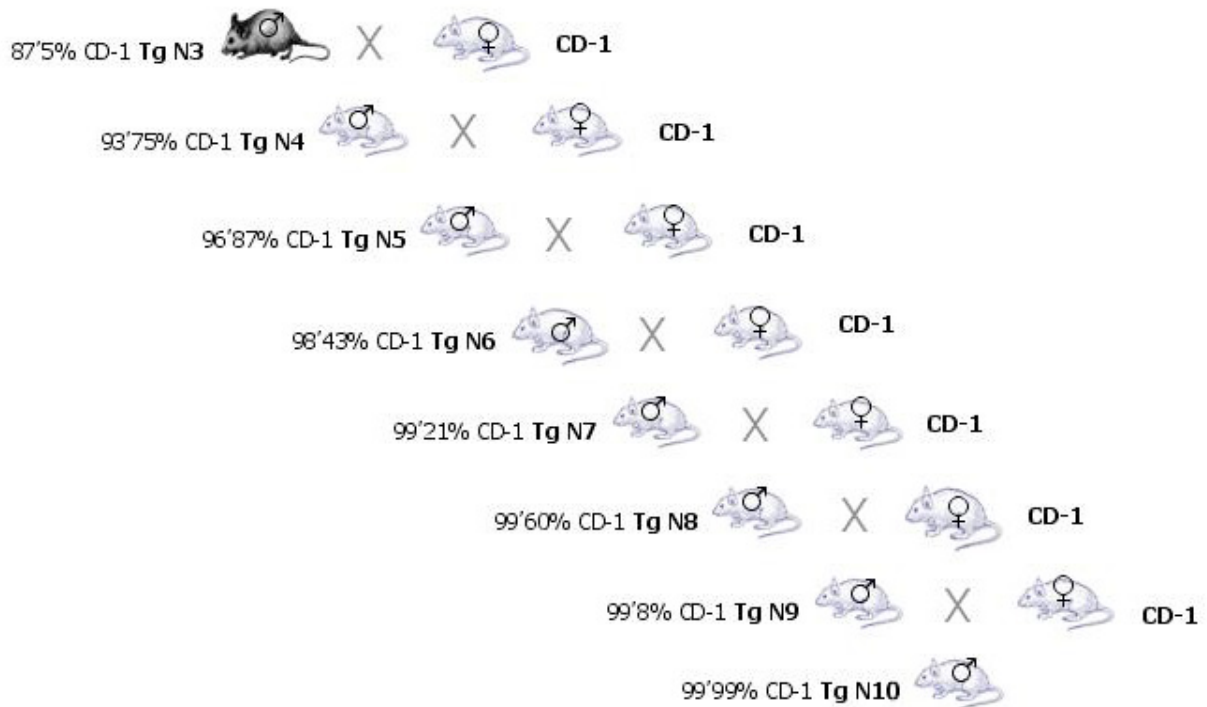
S'ha descrit que la soca de ratolí C57BL/6SJL, mostren resistència a desenvolupar insulinitis induïda pel tractament amb múltiples dosis baixes (40 mg/kg) de STZ. Per contra, la soca de ratolí CD-1 mostra una alta sensibilitat a desenvolupar un procés diabètic autoimmune després d'aquest tractament (Rossini, 1977).

Els interferons són espècie-específics i ratolins que expressen nivells molt alts d'IFN β murí de ratolí són estèrils (Iwakura, 1988). Els ratolins transgènics d'aquest estudi expressen IFN β humà, donat que l'activitat de l'IFN β humà (hIFN β) és 1000 vegades menor que el de ratolí (Derynck, 1980; Wilkinson, 1986). Per tant, semblava més apropiat utilitzar IFN β humà en ratolins transgènics per tal d'evitar efectes no desitjables resultants de l'elevat nivell d'expressió degut al promotor RIP.

En l'estudi previ al treball experimental que presentem, es van obtenir ratolins transgènics RIP/hIFN β en la soca C57BL/6J. Per tal d'obtenir ratolins congènics amb la soca CD-1 es van iniciar els encreuaments de mascles RIP/hIFN β amb femelles CD-1. La descendència obtinguda en la primera generació (N1) presentava un 50% de gens de la soca CD1. En aquest estudi es van obtenir fins a 3 generacions (N3) de ratolins que eren un 87'5% congènics amb aquesta soca.

1.1. OBTENCIÓ I ANÀLISI D'ANIMALS TRANSGÈNICS RIP-hIFN β CONGÈNICS AMB LA SOCA CD-1.

El número mínim de generacions per obtenir una línia congènica és com a mínim de 10 generacions (N10). En el present treball experimental es van continuar retroencreuant fins a 7 vegades més (N10) mascles RIP-hIFN β amb femelles CD-1 de manera que es va obtenir una colònia de ratolins amb un 99'99% dels seus gens de la soca CD-1. Aquests animals eren idèntics a la soca CD-1 a cada locus excepte en el transgen que és el caràcter escollit per la selecció positiva.



Esquema 1. Obtenció de ratolins transgènics congènics amb la soca CD-1. Representació esquemàtica dels retrocreuaments realitzats per obtenir ratolins transgènics RIP-hIFN β amb el fons genètic de la soca CD-1 donat que aquesta soca és més susceptible a desenvolupar diabetis.

1.2. ANÀLISI HISTOLÒGICA DELS PÀNCREES DELS RATOLINS TRANSGÈNICS RIP/hIFN β .

1.2.1. Anàlisi de l'expressió d'hIFN β en la cèl·lula β en pàncrees de ratolins RIP/IFN β

Després d'haver obtingut ratolins transgènics heterozigots que expressaven interferó β humà, amb un 100% en el fons genètic CD-1, es va procedir a analitzar immunohistoquímicament si mantenien l'expressió del transgen en les cèl·lules β pancreàtiques. Així, només en els illots dels ratolins transgènics era possible detectar la presència de hIFN β (Fig. 1A,B). També es va analitzar l'expressió de la insulina en els illots controls i transgènics i no es van observar diferències entre ells (Fig. 1C,D). A més, es va observar que hi havia co-localització de la citoquina i l'hormona, donat que la síntesi de totes dues proteïnes estava regulada pel mateix promotor, el del gen de la insulina (Fig. 1E,F).

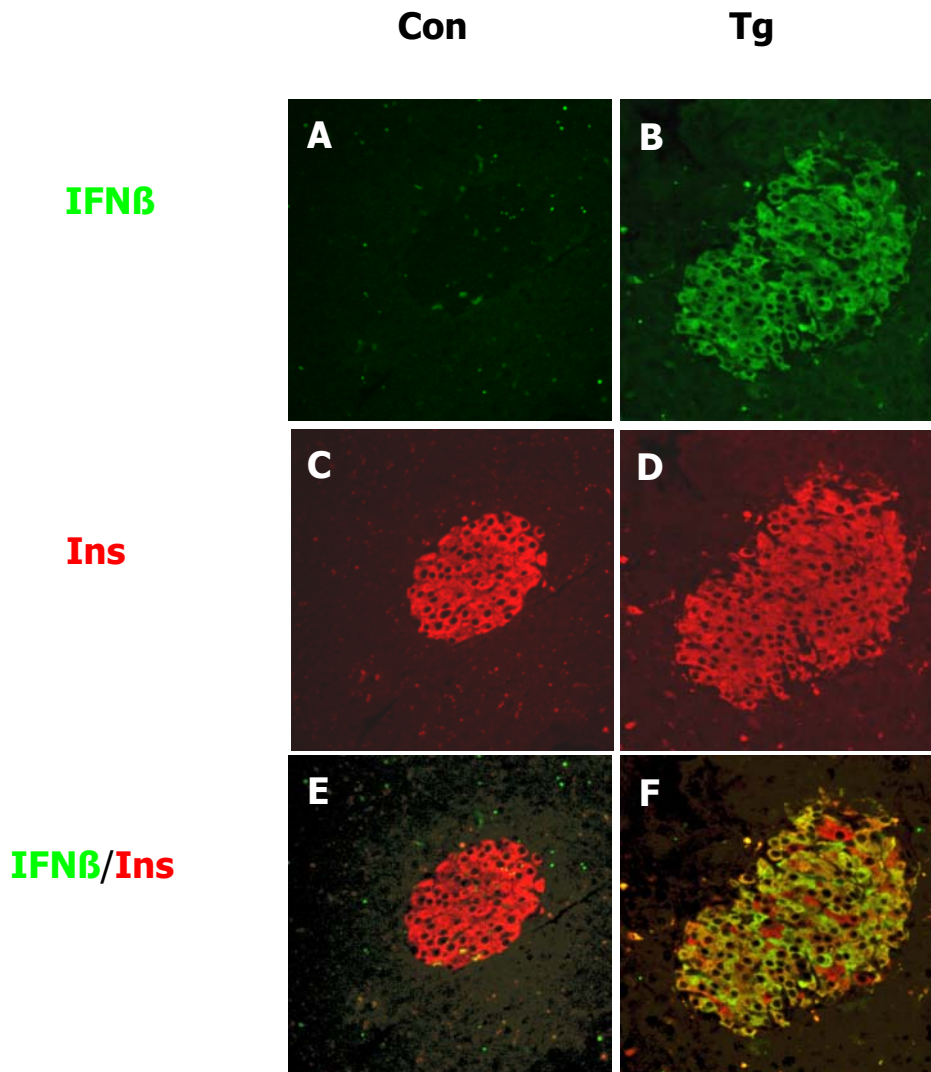


Figura 1. Anàlisi histològica del pàncrees dels animals controls i transgènics. Es van realitzar talls histològics de pàncrees de ratolins mascles de 3 mesos d'edat controls (A,C i E) i transgènics (B,D i E). Anticossos contra: anti-IFN β (A,B), anti-Insulina (C,D) i doble anti-IFN β i anti-Insulina (E,F). Ampliació 400X (Confocal).

1.2.2. Anàlisi immunohistoquímica del pàncrees d'animals transgènics RIP/hIFN β

Paral·lelament, es van dur a terme anàlisis immunohistoquímiques per examinar la morfologia i distribució de les cèl·lules endocrines pancreàtiques dels animals transgènics RIP/hIFN β . Així, es va observar que els ratolins controls i transgènics no presentaven diferències en l'expressió del transportador de glucosa Glut-2, que en pàncrees és específic de cèl·lula β (Fig. 2A,B). Quan s'examinava la distribució de les cèl·lules de l'illot no

s'observaven diferències ni en la distribució en les cèl·lules α , productores de glucagó, ni en la distribució de les cèl·lules β , productores d'insulina, entre els ratolins controls i transgènics (Fig. 2C,D).

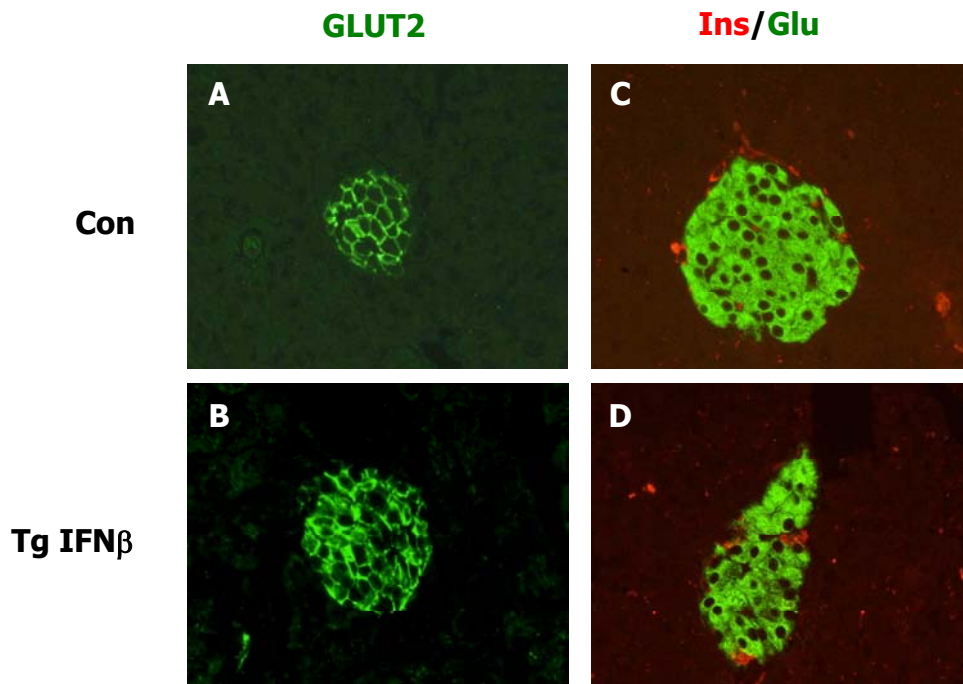


Figura 2. Anàlisi histològica dels pàncrees de ratolins transgènics RIP/hIFN β . Es van fer talls histològics de pàncrees controls (A,C) i transgènics (B,D) de ratolins mascles de 3 mesos d'edat. **(A,B)** Es van incubar les mostres amb anticossos anti-Glut-2 (verd) , **(C,D)** anti-insulina (verd) i anti-glucagó (vermell), com s'indica a Materials i Mètodes. Amplificació 400x (A,B) i 400x (C,D).

1.3. DETERMINACIÓ DELS NIVELLS CIRCULANTS DE hIFN β , INSULINA I GLUCOSA EN RATOLINS TRANSGÈNICS.

Per tal de determinar si hIFN β era capaç de sortir de les cèl·lules β i circular lliurement per tot el cos, vam determinar els valors sèrics de la citoquina en ratolins mascles de 3 mesos d'edat. Així, es va observar que els ratolins transgènics presentaven nivells circulants de hIFN β , mentre que els ratolins controls no presentaven valors detectables de la proteïna, donat que els ratolins controls no expressaven hIFN β (Fig. 3).

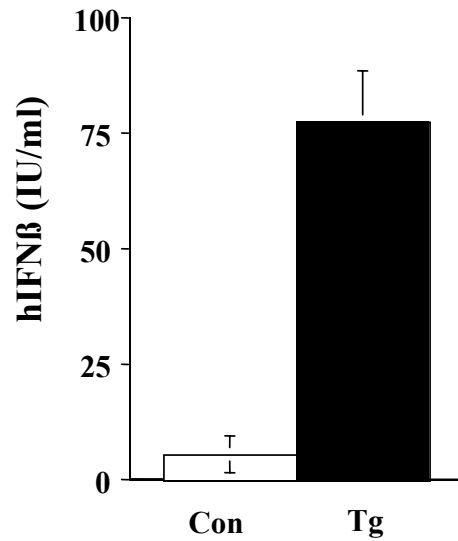


Figura 3. Nivells circulants de hIFN β en ratolins transgènics RIP/IFN β . Valors de hIFN β en 10 mascles transgènics i 12 controls alimentats, als 3 mesos d'edat. L'hIFN β es va determinar en sèrum per ELISA. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 10 animals de cada grup.

També, es van mesurar la glicèmia i els nivells circulants d'insulina en ratolins transgènics, ja que aquests paràmetres solen estar alterats en processos diabètics. Tot i que al voltant d'un 9% dels animals presentaven hiperglicèmia, poliúria, polidípsia i acabaven desenvolupant diabetis de forma espontània (resultats no mostrats), la resta d'animals transgènics eren normoglicèmics, normoinsulinèmics (Fig. 4). A més, no s'observaven diferències significatives respecte als ratolins controls en el pes corporal (als 4 mesos: els animals controls 51.43 ± 1.42 g i els animals transgènics 50.58 ± 1.77 g).

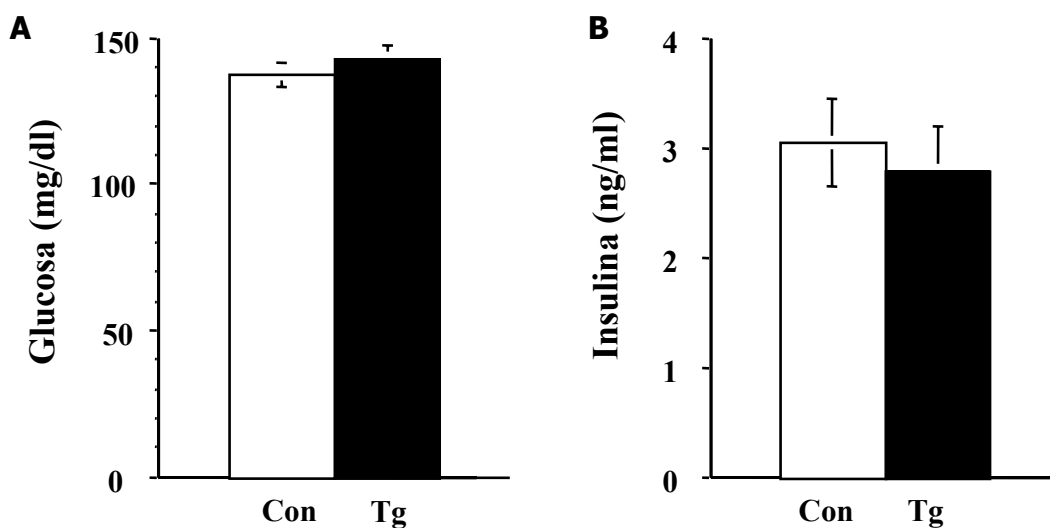


Fig 4. Glicèmia i insulinèmia. Es van determinar als 3 mesos d'edat els nivells de glucosa en sang (A) i d'insulina (B) en el sèrum de mascles controls i transgènics alimentats. Es representa la mitja \pm SEM, (Controls, n=16 i transgènics, n=20).

Per la realització de l'estudi que presentem a continuació es varen utilitzar animals transgènics que presentaven nivells de glicèmia i insulinèmia similars als dels animals controls. A més, aquests animals eren sans, fèrtils, es reproduïen amb normalitat i tenien una viabilitat del 100% més enllà de 18 mesos.

1.4. ANÀLISI DEL GRAU D'INSULITIS DELS ANIMALS TRANSGÈNICS RIP/hIFN β .

A continuació es va determinar el grau d'insulitis (infiltració limfocitària) en pàncrees dels ratolins controls i transgènics normoglicèmics de 2 mesos d'edat. Per això, es van sacrificar els animals i posteriorment es va realitzar un estudi histològic del pàncrees. Així, es va observar que mentre que els ratolins controls presentaven pràcticament el 100% dels illots sense infiltració, el ratolins transgènics mostraven el 40% dels illots infiltrats en diferent grau (Fig. 5). En la majoria dels illots infiltrats s'hi detectava majoritàriament periinsulitis, un menor percentatge d'illots presentaven insulitis i uns pocs illots insulitis severa (Fig. 6). Això, demostrava que el fet d'expressar hIFN β en la cèl·lula β posava en marxa una resposta autoimmune contra la mateixa. Però, donat que un 60% dels illots no presentaven infiltració, aquests eren capaços de secretar suficient insulina per a mantenir la normoglicèmia.

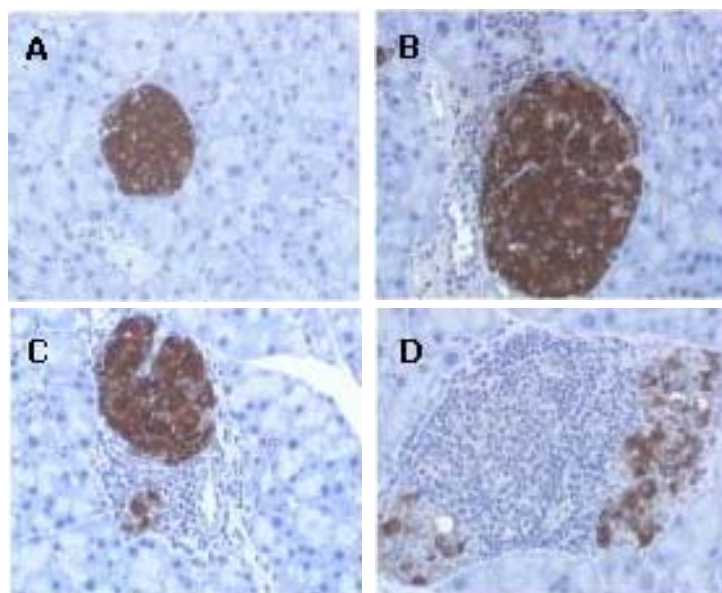


Figura 5. Classificació histològica del grau d'infiltració. Talls histològics de pàncrees van ser tractats amb un anticòs anti-insulina. **(A)** Illot sense infiltració, grau 0. **(B)** Illot amb periinsulitis, menys del 25 % de l'illot està infiltrat, grau < 25%. **(C)** Illot amb insulitis, presència de cèl·lules immunitàries en menys d'un 50 % de la superfície de l'illot, grau < 50%. **(D)** Illot amb insulitis severa, més del 50 % de la superfície de l'illot està infiltrada, grau > 50%.

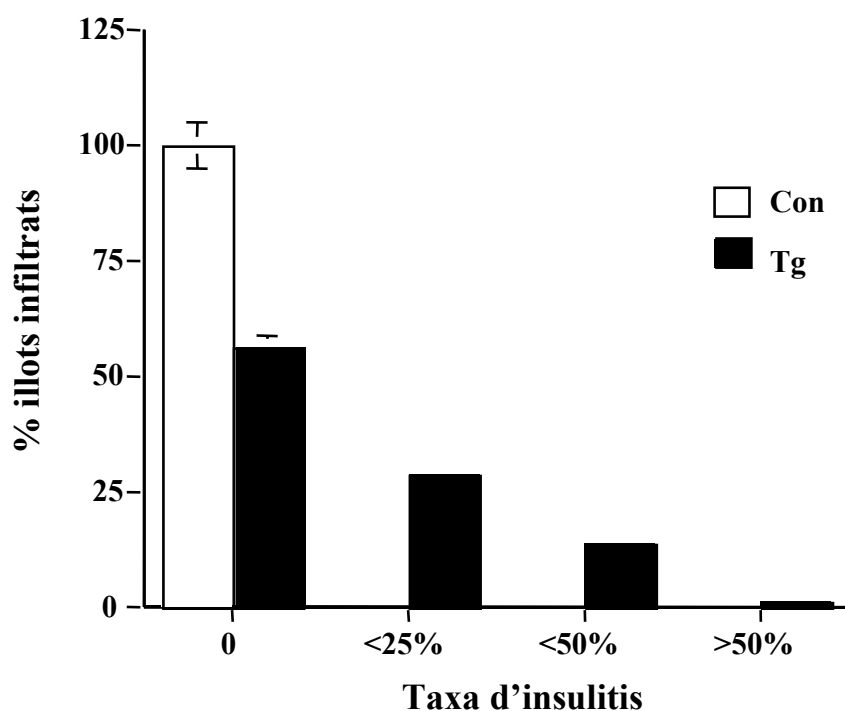


Figura 6. Anàlisi del grau d'insulitis en pàncrees d'animals transgènics RIP/hIFN β . Es van sacrificar ratolins mascles controls i transgènics de 2 mesos d'edat. Es varen analitzar el grau d'infiltració limfocitària en talls histològics de pàncrees tractats amb un anticòs anti-insulina, tal i com s'indica en l'apartat de Materials i Mètodes. Es van analitzar més de 250 illots per pàncrees i 3 animals per grup. Els resultats són la mitja \pm SEM.

2. ESTUDI DE L'EFECTE DEL TRACTAMENT AMB DIFERENTS DOSIS BAIXES D'ESTREPTOZOTOCINA (STZ) EN ANIMALS RIP/hIFN β .

Les infeccions víriques han estat associades al desenvolupament de la diabetis (Jaeckel, 2002), i en aquest procés, hi tenen un paper important els interferons de tipus I (Horwitz, 2002). Si els interferons poden intervenir en el dany a les cèl·lules β , en l'alliberament d'antígens i l'activació de cèl·lules T reactives, el tractament amb STZ podria activar la resta de cèl·lules immunitàries provocant un ràpid desenvolupament de la diabetis en els animals transgènics RIP/hIFN β . Així, amb la finalitat d'esbrinar, aprofundir i valorar el paper de l'IFN β com a mediador de la resposta autoimmunitària conjuntament amb l'efecte de factors externs es van tractar animals controls i transgènics amb molt baixes dosis de STZ. D'aquesta manera una diferent susceptibilitat al tòxic posaria de manifest la importància del paper de l'IFN β en el desenvolupament de la diabetis tipus 1.

2.1. ANÀLISI DE LA SENSIBILITAT A DOSIS DE 30 I 25 mg DE STZ EN ANIMALS TRANSGÈNICS I CONTROLS.

En estudis anteriors ja s'havia observat que els ratolins transgènics RIP/hIFN β (N3) amb la soca CD-1 eren més sensibles que els ratolins controls al tractament amb STZ (40 mg/kg de pes) durant 5 dies consecutius. En la primera generació (N1) obtinguda d'aquests animals els ratolins transgènics presentaven, 7 dies després de la injecció, valors d'hiperglicèmia característics de la diabetis. Pel contrari, els ratolins controls mostraven valors normals de glicèmia al mateix temps, mentre que s'observava un increment de la seva glicèmia després de 14 dies del tractament (Pelegri, 1998).

Amb la finalitat de determinar en quin grau els ratolins transgènics (N10) heterozigots eren més susceptibles al tractament amb STZ, i discernir el paper citotòxic i immunoestimulador d'aquesta droga en els pàncrees d'aquests animals, vàrem administrar intraperitonealment dosis de 30 o 25 mg/kg STZ durant 5 dies consecutius a mascles de dos mesos d'edat. Abans d'iniciar el tractament es va mesurar la glicèmia dels dos grups d'animals i posteriorment es va realitzar un seguiment de l'evolució de la glicèmia durant 60 dies. En determinar els nivells de glucosa en els ratolins controls tractats amb 30 mg de STZ/kg, s'observava un augment progressiu de la seva glicèmia fins assolir valors de 400 mg/dl al cap de 2 mesos de l'inici del tractament (Fig. 7). De la mateixa manera el grup controls tractat amb 25 mg de STZ/kg també presentaven un increment de la glucosa sanguínia lleugerament més gradual, però assolint igualment valors de 400 mg/dl al final de l'experiment (Fig. 7). Pel contrari, els ratolins transgènics tan el grup tractat amb 30 mg de STZ com el tractat amb 25 mg de STZ/Kg de pes, mostraven una alta sensibilitat a la droga (Fig. 7). Al cap de 40 dies després del tractament els ratolins RIP/hIFN β presentaven una hiperglicèmia que superava el límit màxim de detecció de l'aparell (600 mg/dl). A més a més, l'augment de la glicèmia no era progressiu com en el cas del grup controls, sinó que als 10 dies el grup tractat amb 30 mg de STZ ja assolía valors sanguinis de 450 mg/dl de glucosa. De manera similar, als 20 dies de tractament el grup tractat amb 25 mg de STZ assolía valors de 450 mg/dl (Fig. 7). Tot això ens indicava que els ratolins que expressen RIP/hIFN β en el pàncreas eren molt més sensibles a l'acció de la STZ i també es mostraven més susceptibles a desenvolupar diabetis.

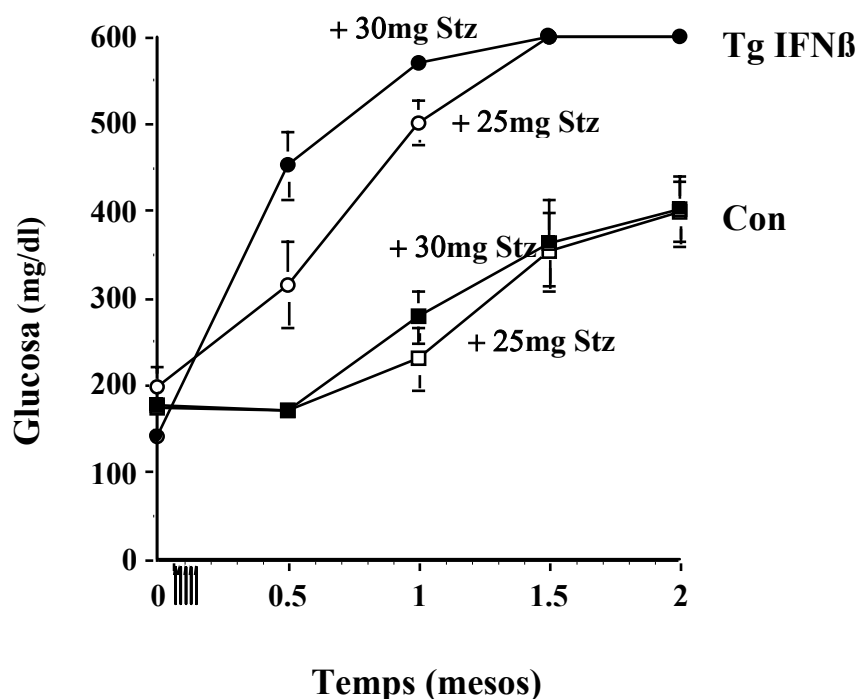


Figura 7. Evolució de la glicèmia dels ratolins controls i transgènics tractats amb múltiples dosis d'estreptozotocina. Es varen injectar a animals controls i transgènics dosis de STZ subdiabetogèniques (30 o 25 mg/Kg de pes viu) diàriament durant 5 dies consecutius. Posteriorment, es va realitzar un seguiment de la glicèmia de tots els animals durant 2 mesos. Els valors són la mitja \pm S.E.M. En cadascun dels experiments es van utilitzar 10 mascles controls i 10 mascles transgènics.

2.2. OBTENCIÓ DE RATOLINS DIABÈTICS PER TRACTAMENT AMB DOSIS DE 20 i 15 mg/kg DE STZ.

En observar que els ratolins transgènics eren molt sensibles a dosis de STZ inferiors a les habitualment utilitzades, a continuació es van provar dosis més baixes (15 i 20 mg/kg). Això, afavoria que l'efecte de la STZ fos menys tòxic i més immunoestimulador. A més, es volia trobar una dosi que no afectés als ratolins controls i d'aquesta manera examinar només els efectes inductors del mecanisme immunitari de la STZ sobre un ratolí susceptible a desenvolupar diabetis, com els ratolins RIP/hIFN β .

Així, es varen tractar animals mascles controls i transgènics amb 20 o 15 mg de STZ/kg de pes durant 5 dies consecutius. Posteriorment, es va realitzar el seguiment de la glicèmia en ambdós grups durant 4 mesos. Es va observar que l'administració tant de 20 mg com de 15 mg de STZ/kg en els animals controls no provocava cap canvi en els valors de glicèmia, ja que aquests es mantenien dins els nivells normals durant tot l'experiment (Fig. 8A,B). En

canvi, els animals transgènics tractats amb 15 mg STZ/kg presentaven un increment progressiu de la glicèmia assolint valors >250 mg/dl al mes d'haver iniciat el tractament (Fig. 8A). L'augment de la glicèmia era gradual i arribava a valors de 400 mg/dl al finalitzar l'experiment.

Per contra, els ratolins transgènics tractats amb 20 mg STZ/kg, presentaven un ràpid augment de la glicèmia en comparació amb els animals tractats amb 15 mg de STZ. Als 15 dies ja assolien valors de 250 mg/dl. La glicèmia incrementava durant els dies posteriors fins assolir valors de 400 mg/dl als 2 mesos d'haver iniciat el tractament (Fig. 8B). Després de 2,5 mesos de l'inici del tractament ja presentaven valors de glicèmia que superaven el límit de detecció de l'aparell (>600 mg/dl). Aquests resultats indicaven que es tractava d'un procés crònic, molt probablement per un mecanisme inflamatori contra la cèl·lula β .

Per tal de determinar el grau de destrucció dels illots pel procés inflamatori es va procedir a analitzar el grau d'insulitis. Així, es varen sacrificar un grup d'animals controls i transgènics tractats amb 15 o 20 mg STZ/kg als 2 mesos d'iniciar el tractament i un altre grup d'animals als 4 mesos, en finalitzar l'estudi. Un cop realitzades les necròpsies, els pàncrees es van incloure i tot seguit es va procedir a l'estudi immunohistoquímic utilitzant un anticòs contra la insulina. Quan s'analitzaven els talls histològics dels animals sacrificats als 2 mesos d'iniciar l'estudi, s'observava que els ratolins transgènics d'ambdós grups, 15 i 20 mg STZ/kg, ja presentaven un menor nombre de cèl·lules β productores d'insulina (Fig. 8C-F i Fig. 9B,D,F). En canvi, els ratolins controls presentaven un nombre normal de cèl·lules tenyides per insulina i es conservava l'estructura del illot (Fig. 8C-F i Fig. 9A,C,E).

Així, mentre que als 2 mesos després del tractament els ratolins controls tractats amb 15 mg STZ/kg presentaven aproximadament el 80% dels illots sense d'infiltració i un 20% amb una lleugera periinsulitis, els ratolins transgènics tractats amb aquesta dosi de STZ presentaven el 70% dels illots infiltrats en diferent grau (Fig. 8C). Així, els pàncrees transgènics mostraven el 25% dels illots amb periinsulitis, un 30% presentaven insulitis i en un 15% dels illots s'hi observava insulitis severa (Fig. 8C). De la mateixa manera, es van examinar els pàncrees procedents d'animals controls i transgènics tractats amb 15 mg STZ/kg sacrificats als 4 mesos d'haver iniciat el tractament. En els pàncrees controls als 4 mesos del tractament només s'observava una lleugera periinsulitis en el 10% dels seus illots (Fig. 8E).

En canvi, en els pàncrees transgènics, s'observava un increment en el nombre d'illots amb insulitis. Això concordava amb la disminució en el nombre d'illots sense infiltració (Fig. 8E).

L'anàlisi dels pàncrees procedents de ratolins transgènics tractats amb 20 mg STZ/kg i sacrificats als 2 mesos de tractament, presentaven el 80% dels illots infiltrats (Fig. 8D). Així, un 30% dels illots presentaven al voltant d'un 50% d'infiltració. Un 30% mostraven insulitis severa i només un 20% dels illots no presentaven gens d'infiltració. Al contrari, els ratolins controls tractats amb 20 mg STZ presentaven només al voltant del 25% dels illots infiltrats en diferent grau (Fig. 8D). Quan s'examinaven els pàncrees procedents dels animals sacrificats als 4 mesos de tractament, s'observava que els pàncrees transgènics tenien el 100% dels illots infiltrats i que un 60% d'aquests illots presentaven insulitis severa. Per contra, els pàncrees procedents dels ratolins controls, presentaven aproximadament el 85% dels illots intactes i només el 15% d'ells mostraven periinsulitis (Fig. 8F).

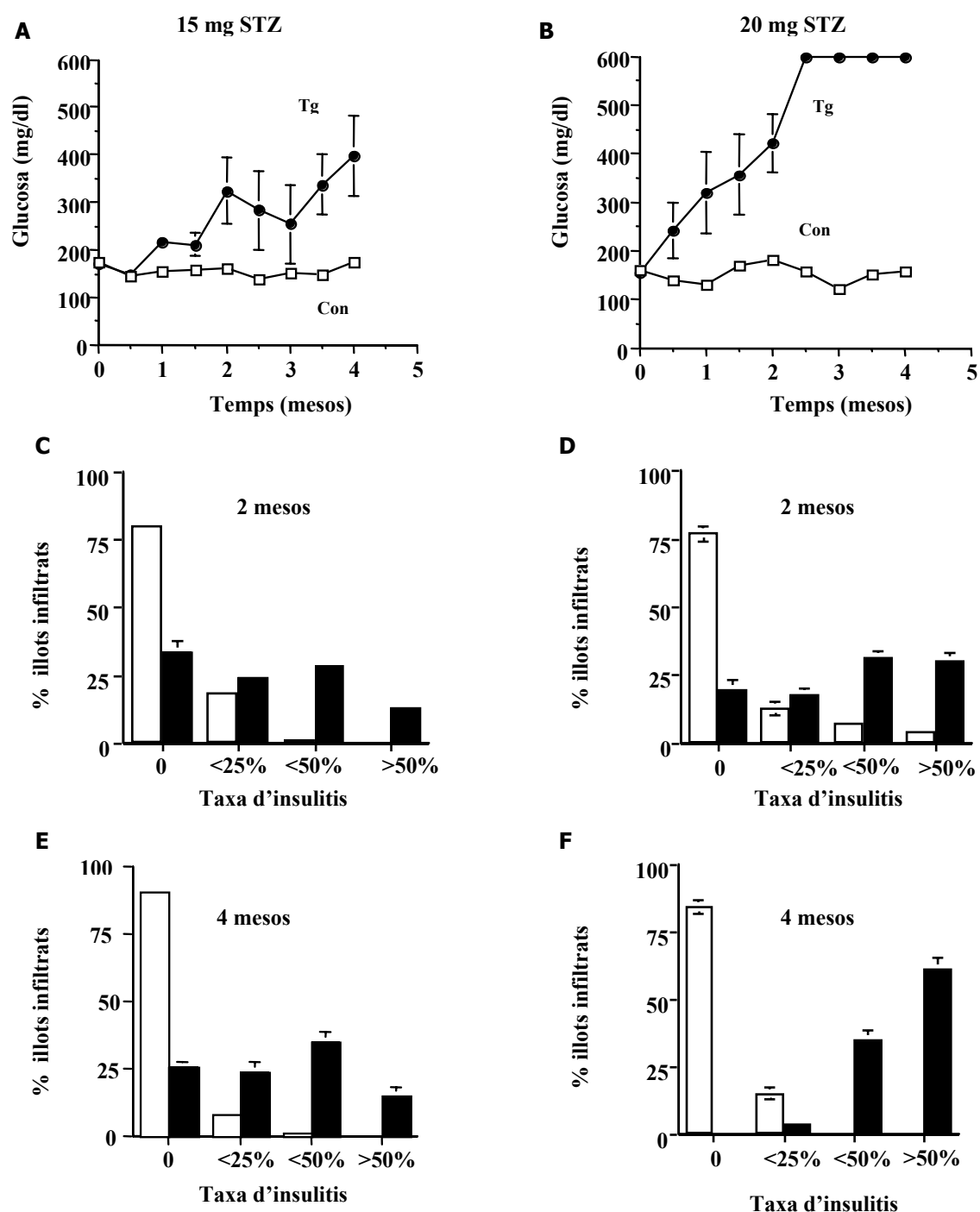


Figura 8. (A,B) Evolució de la glicèmia dels ratolins controls i transgènics tractats amb dosis de 15 o 20 mg/Kg de STZ. Es varen injectar dosis de STZ subdiabetogèniques 15 (A) o 20 (B) mg/Kg de pes a animals controls i transgènics durant 5 dies consecutius. Posteriorment es va fer un seguiment de la glicèmia de tots els animals fins els 4 mesos. **(C-F) Anàlisi del grau d'infiltració (insulinitis) en ratolins controls i transgènics tractats amb dosis de 15 o 20 mg/Kg de STZ.** (C,E) Es varen sacrificar els animals tractats amb 15 mg de STZ després de 2 i 4 mesos de tractament, i es varen analitzar les lesions en els illots d'animals controls i transgènics mitjançant tècniques d'immunohistoquímica. Utilitzant un anticòs anti-insulina es va realitzar l'anàlisi morfològica del grau d'insulinitis, tal com s'indica als Mètodes. (D,F) De la mateixa manera, es van sacrificar als 2 i 4 mesos de tractament el grup de ratolins tractats amb 20 mg de STZ. Els quadrats blancs representen als controls i els quadrats negres als transgènics. Els valors són la mitja \pm S.E.M. En cadascun dels experiments es van utilitzar 10 mascles controls i 10 mascles transgènics. Per realitzar l'anàlisi morfològic es van analitzar més de 250 illots i es van utilitzar 3 animals per grup.

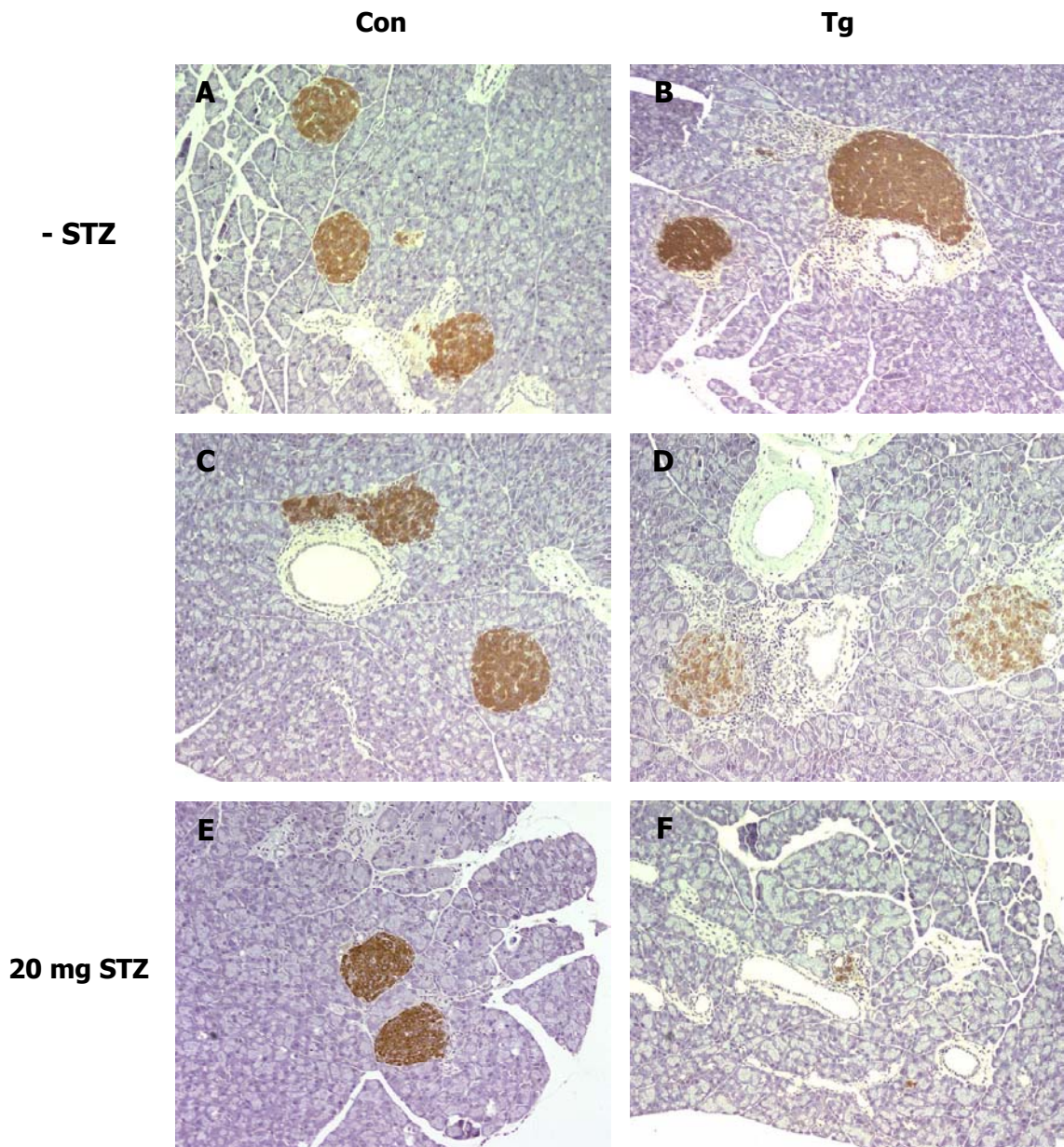


Figura 9. Anàlisi immunohistoquímica del grau d'infiltració en els ratolins transgènics IFN β després del tractament amb dosis múltiples de 15 o 20 mg de STZ. Es varen sacrificar els animals tractats amb dosis de 15 o 20 mg de STZ després de 2 mesos de l'administració de la droga. Es van realitzar talls histològics dels pàncrees procedents d'animals controls (A,C,E) i transgènics (B,D,F) i es van incubar amb un anticòs anti-insulina, tal com s'indica en els Mètodes. Amplificació X100.

2.2.1. Anàlisi del percentatge d'individus que desenvolupen diabetis tipus 1 després del tractament amb STZ.

Per determinar el nombre d'individus que acabaven desenvolupant diabetis després del tractament amb STZ, es va analitzar el percentatge d'individus que presentaven hiperglicèmia (>250 mg/dl) al llarg del temps. Així, el 33'3% dels ratolins controls tractats amb 30 mg STZ/kg presentaven diabetis als 20 dies d'haver iniciat el tractament (Fig. 10A). En canvi, quan es tractaven amb 25 mg STZ/kg el 25% dels ratolins controls desenvolupaven diabetis al cap d'un mes (Fig. 10A). Per contra, el 100% dels ratolins transgènics tractats amb 30 mg STZ/kg presentaven diabetis oberta pocs dies després del tractament. Quan es tractaven amb 25 mg STZ/kg el 100% dels ratolins transgènics ja eren diabètics als 20 dies d'haver administrat STZ (Fig. 10A).

Quan s'analitzaven els animals tractats amb 20 o bé amb 15 mg STZ/kg, no s'observà l'aparició de diabetis en cap dels ratolins controls dels dos grups experimentals, ni els tractats amb 15 mg ni els tractats amb 20 mg de STZ/kg (Figura. 10B). No obstant, als 15 dies d'haver iniciat l'estudi, el 50% dels ratolins transgènics tractats amb 20 mg STZ/kg, ja presentaven valors de glicèmia superiors a 250 mg/dl. En canvi, s'observà un retard en l'aparició de diabetis oberta en els ratolins transgènics tractats amb 15 mg STZ/kg. Així, no era fins el mes i mig que el 50% d'aquests animals presentaven valors de glicèmia superiors a 250 mg/dl. El 100% dels animals transgènics tractats amb 20 mg STZ/kg, eren diabètics al mes i mig d'iniciar l'estudi. I el 100% dels ratolins transgènics tractats amb 15 mg de STZ no presentaven diabetis fins els 2.5 mesos (Fig. 10B).

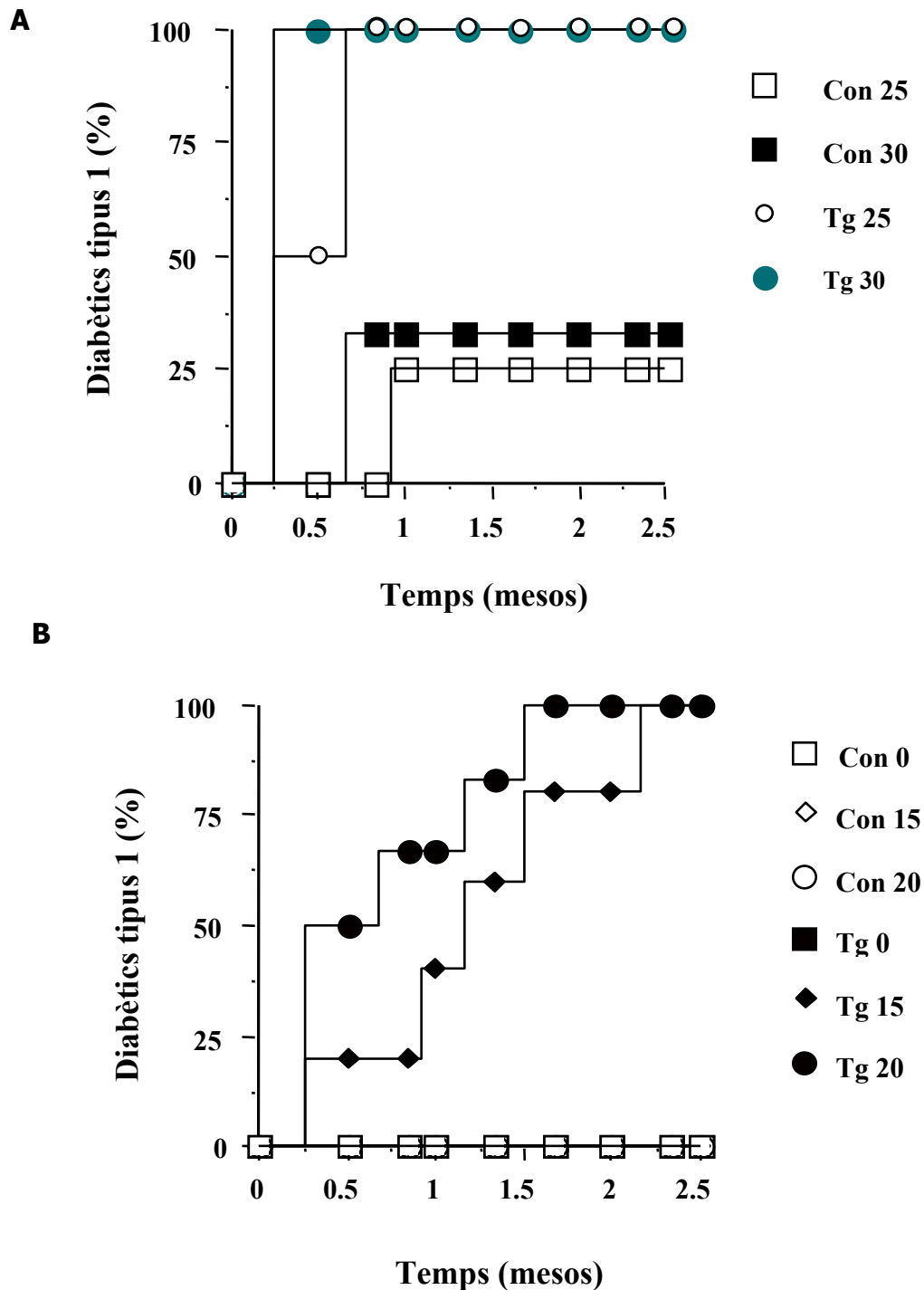


Fig 10. Evolució del percentatge d'individus que desenvolupaven diabetis. Es determinava si un individu era diabètic quan la seva glicèmia superava en 2 mesures consecutives valors de 250mg/dl. **(A)** Percentatge d'individus diabètics en animals tractats amb 25 o 30 mg de STZ. **(B)** Percentatge d'individus diabètics en animals tractats amb 15 o 20 mg de STZ.

2.2.2. Anàlisi immunohistoquímica per tal de caracteritzar la insulinitis present en els illots dels ratolins transgènics RIP/hIFN β tractats amb 20 mg de STZ.

En observar la presència de cèl·lules immunitàries en els illots dels pàncrees procedents dels ratolins transgènics, es va determinar el tipus de cèl·lules immunes presents en aquests infiltrats. S'ha descrit que la diabetis tipus 1 és primerament una malaltia mitjançada per limfòcits T (Tish, 1996). L'anàlisi immunohistoquímica dels pàncrees d'individus diabètics demostra que els leucòcits infiltrats són cèl·lules T. Les cèl·lules T amb propietats diabetogèniques pertanyen o bé a la classe col·laboradora ("helper") CD4⁺, o bé a la classe citotòxica CD8⁺, i ambdues classes s'han trobat tant en illots infiltrats d'animals models de diabetis tipus 1 (ratolins NOD) com en pacients humans.

Així, amb la finalitat de detectar la presència de limfòcits T, i determinar-ne la classe a què pertanyien, es va realitzar l'anàlisi immunohistoquímica amb un anticòs contra insulina conjuntament amb un anticòs contra CD8, o amb un anticòs contra CD4. Quan s'observaven els talls histològics dels pàncrees procedents de ratolins transgènics RIP/hIFN β sense tractament amb STZ, s'hi podia detectar la presència de cèl·lules T CD8⁺. De la mateixa manera, quan es realitzava la doble immunodetecció amb insulina i CD4, també s'hi podien observar la presència de cèl·lules T auxiliars (CD4⁺) en alguns dels seus illots (dades no mostrades). Pel contrari, els pàncrees dels ratolins controls sense tractament, no s'hi podia detectar cap dels dos tipus de cel·lulars (dada no mostrada). Això estaria d'acord amb els resultats de l'estudi de la taxa d'infiltració d'aquests pàncrees presentats anteriorment, en els que només es detectava infiltració en els pàncrees dels ratolins transgènics (Fig. 6).

En l'anàlisi dels pàncrees dels animals tractats amb 20 mg de STZ/kg, s'observava un augment de la presència de limfòcits T CD8 i CD4 al voltant de la majoria dels illots dels ratolins transgènics (Fig. 11). En canvi, en els pàncrees controls no s'hi detectaven cèl·lules limfocitàries, fet que estaria d'acord amb els resultats de l'anàlisi de la taxa de infiltració, on no s'observava pràcticament gens d'insulinitis (Fig. 8F).

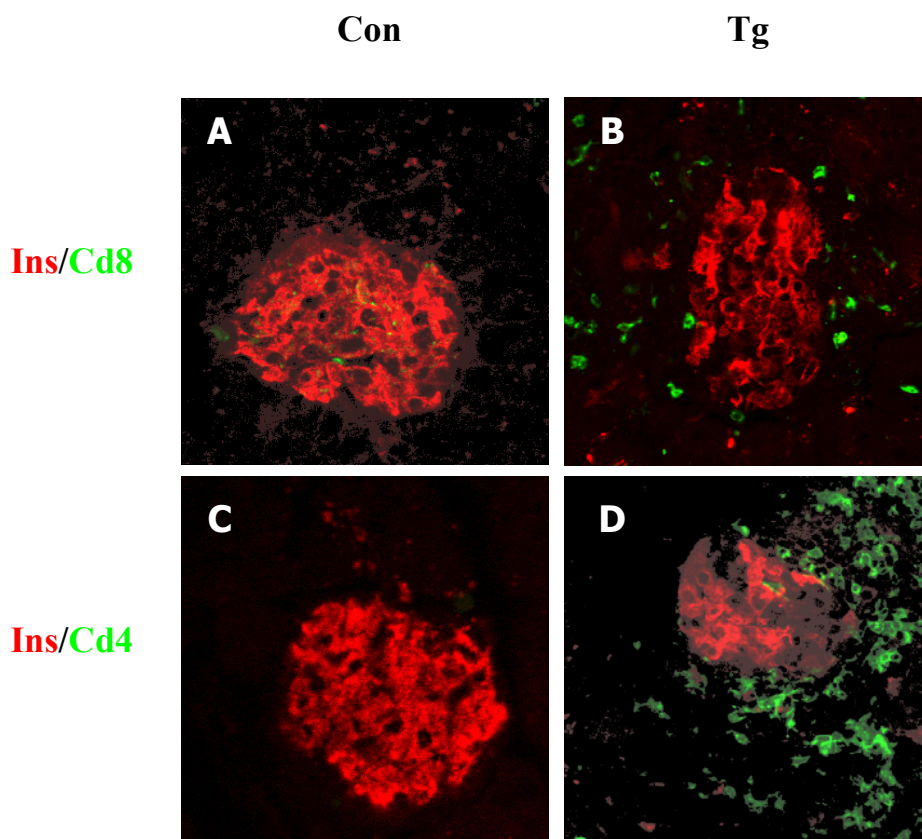


Figura 11. Anàlisi immunohistoquímica de marcadors limfocitaris en pàncrees tractats amb STZ. Es van realitzar talls histològics de pàncrees d'animals controls (**A,C**) i transgènics (**B,D**) tractats amb 5 dosis de 20 mg STZ/kg. A continuació es van incubar amb anticossos anti-Insulina (vermell) i anti-CD8 (verd) (**A,B**), i amb anticossos anti-Insulina (vermell) i anti-CD4 (verd) (**C,D**), com s'indica en els Materials i Mètodes. Amplificació 400X.

2.2.3. Determinació dels nivells circulants d'insulina.

Els nivells d'insulina circulants es van determinar també als 4 mesos d'haver iniciat el tractament amb STZ. No es varen observar diferències significatives entre controls i transgènics sense tractar (Fig. 12). En canvi, els ratolins controls tractats amb STZ presentaven una lleugera disminució al voltant del 23% dels nivells d'insulina en sèrum després de 4 mesos del tractament. Aquesta disminució era similar tant en el grup tractat amb 15 mg de STZ/kg com en el grup tractat amb 20 mg, i no era suficient com per afectar a la seva glicèmia (Fig. 12). Per contra, s'observava una gran disminució en la insulinèmia

tant en els animals transgènics tractats amb 15 mg STZ com els tractats amb 20 mg STZ, ambdós grups d'animals eren hipoinsulinèmics. No obstant, els ratolins transgènics tractats amb 15 mg presentaven una menor disminució dels nivells circulants d'insulina. Això estaria d'acord amb què també presentaven un menor augment de la glicèmia i una menor inflamació en els illots, comparat amb els transgènics tractats amb 20 mg de STZ. Això indicava l'existència d'una dosi resposta entre la dosi de STZ administrada i l'inici i progressió de diabetis tipus 1.

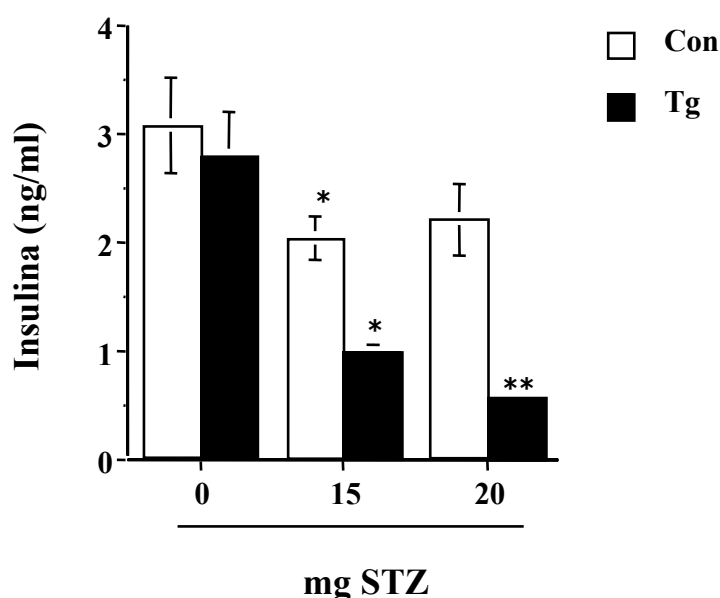


Figura 12. Nivells d'insulina en animals tractats amb STZ. Valors d'insulinèmia en animals controls i transgènics alimentats, després de 4 mesos de tractament. Els resultats són la mitja \pm SEM. Controls i transgènics sense tractar amb STZ, $n=15$ i $n=16$, respectivament; controls tractats amb 15 o 20 mg STZ, $n=10$ per grup; transgènics amb 15 mg STZ, $n=10$ i transgènics tractats amb 20 mg, $n=15$.

2.2.4. Anàlisi morfomètrica dels pàncrees procedents dels ratolins transgènics RIP/hIFN β .

Amb l'objectiu de determinar si la disminució dels nivells d'insulina en els ratolins transgènics tractats amb STZ, eren causats per una disminució en la massa de cèl·lula β , es va realitzar un estudi morfomètric dels pàncrees procedents de ratolins transgènics i controls. Així, al cap de quatre mesos d'haver iniciat el tractament es varen sacrificar animals controls i

transgènics. Un cop realitzades les necròpsies, els pàncrees es van incloure i es va procedir a l'estudi immunohistoquímica amb un anticòs contra la insulina. A continuació, es va realitzar l'anàlisi morfomètrica d'aquests pàncrees. No es varen observar diferències significatives en la massa de cèl·lules β entre controls i transgènics sense tractar (Fig. 13A). Igualment, els ratolins controls tractats també amb 15 mg de STZ no presentaven cap reducció en la massa de cèl·lula β . Per contra, els ratolins transgènics tractats amb 15 mg de STZ/kg presentaven una reducció del 65% en la massa de cèl·lula β (Fig. 13A). Quan es va determinar la massa de cèl·lula β en els ratolins tractats amb 20 mg de STZ, s'observà una reducció al voltant del 25% en els ratolins controls (Fig. 13A). Aquesta reducció no era suficient per provocar canvis en els valors de la glicèmia, ja que la seva insulinèmia només disminuïa al voltant d'un 20%, i era suficient per mantenir la normoglicèmia. En canvi els ratolins transgènics tractats amb 20 mg STZ presentaven una disminució de fins el 94% en la massa de cèl·lula β (Fig. 13A).

Finalment, també es va procedir a analitzar el contingut d'insulina pancreàtic dels ratolins controls i transgènics, sense tractar i tractats amb 20 mg STZ/kg. Entre els animals controls i transgènics sense tractar amb STZ no s'observaven diferències significatives en el contingut d'insulina emmagatzemat en el pàncrees (Fig. 13B), però sí que es detectaven diferències importants en el contingut dels animals tractats. El contingut d'insulina pancreàtic dels ratolins transgènics es reduïa en un 92% (Fig. 13B). Aquests resultats estaven d'acord amb el percentatge de reducció de la massa de cèl·lula β , amb la hipoinsulinèmia i en la hiperglicèmia que presentaven aquests animals. En canvi, els ratolins controls presentaven un 33% de reducció del seu contingut d'insulina, que no era suficient per alterar la glicèmia i la insulinèmia en aquests animals.

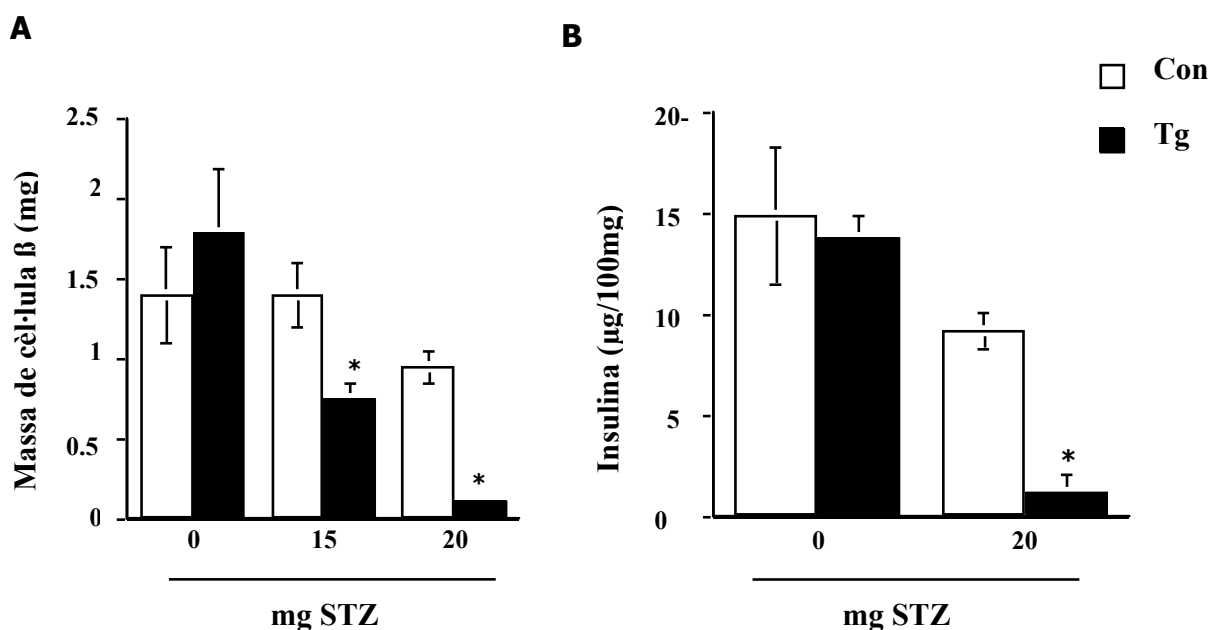


Figura 13. Anàlisi de la massa de cèl·lula β i del contingut pancreàtic d'insulina en animals tractats amb STZ. Després de 4 mesos d'haver iniciat l'estudi es van analitzar pàncrees d'animals controls i transgènics sense tractar i tractats amb STZ. **(A)** Determinació de la massa de cèl·lula β en el grup controls i transgènic tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els valors representen la mitja ± SEM de 9 seccions de pàncrees de 3 animals controls i 3 transgènics. **(B)** Contingut d'insulina de pàncrees controls i transgènics, procedents d'animals sense tractar i d'animals tractats amb 20 mg STZ/kg. Els valors representen la mitja ± SEM de 6 controls i 8 transgènics.

2.2.5. Anàlisi histològica de la mort cel·lular en pàncrees d'animals transgènics tractats amb STZ.

S'ha descrit que l'apoptosi és el mecanisme de mort cel·lular programada mitjançant el qual els individus sans mantenen l'equilibri de la massa cel·lular. En pacients diabètics també està considerat com el mecanisme principal de mort cel·lular durant el desenvolupament de la malaltia. A més, s'ha descrit que la diabetis induïda per la injecció de 5 dosis baixes (40 mg) consecutives d'estreptozotocina provoca la mort de la cèl·lula β per un mecanisme d'apoptosi (O'Brien, 1996). Donat que, els ratolins transgènics tractats amb STZ perdien el 94% de la massa de cèl·lula β, vam examinar mitjançant marcadors apoptòtics si aquesta mort tenia lloc per aquest mecanisme (Fig. 14). Així, vam realitzar una anàlisi immunohistiquímica per poder detectar els nuclis apoptòtics. La tècnica de TUNEL permet marcar els nuclis de les cèl·lules apoptòtiques, gràcies a l'acció de l'enzim transferasa terminal. Aquest enzim actua

unint nucleòtids marcats als fragments trencats del DNA, característica pròpia del procés apoptòtic. Així, es van incubar els pàncrees dels ratolins transgènics amb anticossos: anti-glucagó, anti-PP i anti-somatostatina, i marcatge amb dideoxinucleòtids mitjançant per la transferasa terminal (TUNEL). I es van poder detectar nuclis apoptòtics en les cèl·lules β d'aquests ratolins (Fig. 14A,B). Això, confirmava que la mort de les cèl·lules β era per un mecanisme d'apoptosi.

El sistema Fas, constitueix una de les vies més importants d'inducció de mort cel·lular programada, apoptosi. S'ha descrit que les cèl·lules T poden induir la mort de la cèl·lula β a través d'aquesta via. Per aquesta raó vam determinar la presència de Fas en els illots del ratolins transgènics després 1.5 mesos de ser tractats amb 20 mg/kg STZ. Així, en realitzar l'anàlisi immunohistoquímica amb un anticòs anti-Fas vam observar la presència de cèl·lules positives per aquest marcador (Fig. 14C,D). A més quan s'incubaven els pàncrees amb un anticòs anti-BAD, una proteïna pro-apoptòtica, s'observava l'expressió d'aquesta proteïna en els illots dels ratolins transgènics tractats amb STZ (Fig. 14E,F). Tot això, confirmava que la mort de les cèl·lules β en aquests animals era per un mecanisme d'apoptosi.

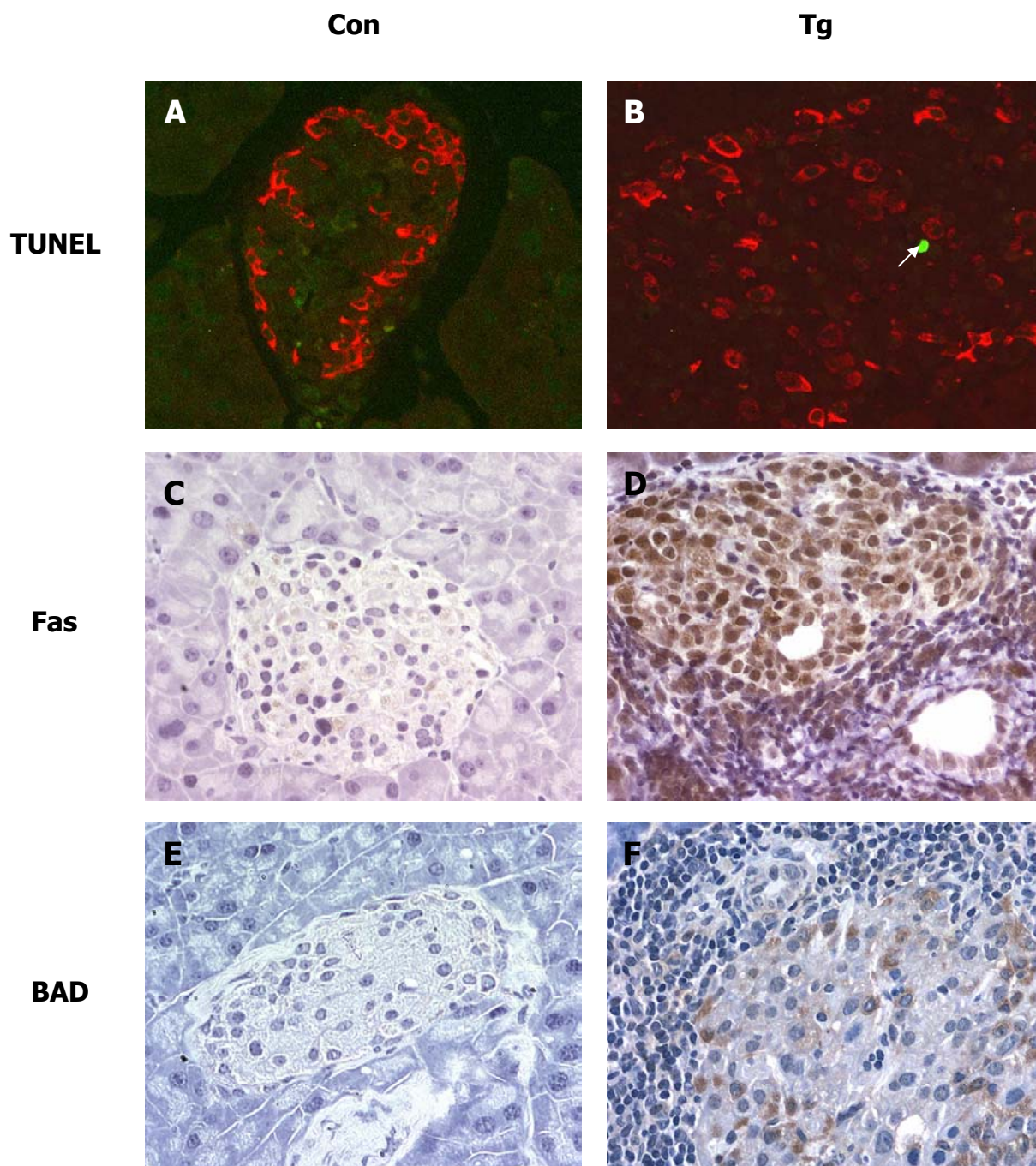


Figura 14. Anàlisi histològica de marcadors apoptòtics en ratolins RIP/IFN β després del tractament amb 20mg/kg de STZ. Es van fer talls histològics de pàncrees de ratolins cotrol (A,C,E) i transgènics (B,D,F) després d'1 mes del tractament amb STZ. Es van incubar amb anticossos: anti-glucagó, anti-somatostatina i anti-PP (vermell) i TUNEL (verd) (A,B), anti-Fas (C,D) i anti-BAD (E,F), tal i com s'indica als Materials i Mètodes. AmplificacióX400.

Tots els resultats obtinguts, ens mostraven que el fet d'expressar hIFN β en les cèl·lules β , conjuntament amb el tractament amb molt baixes dosis de STZ, provocava el desenvolupament de diabetis tipus 1. Així, havíem generat un nou model animal de diabetis, que reproduïa les característiques de la diabetis tipus 1: hiperglicèmia, hipoinsulinèmia, infiltració limfocitària en els illots pancreàtics i una dràstica pèrdua de la massa de cèl·lula β .

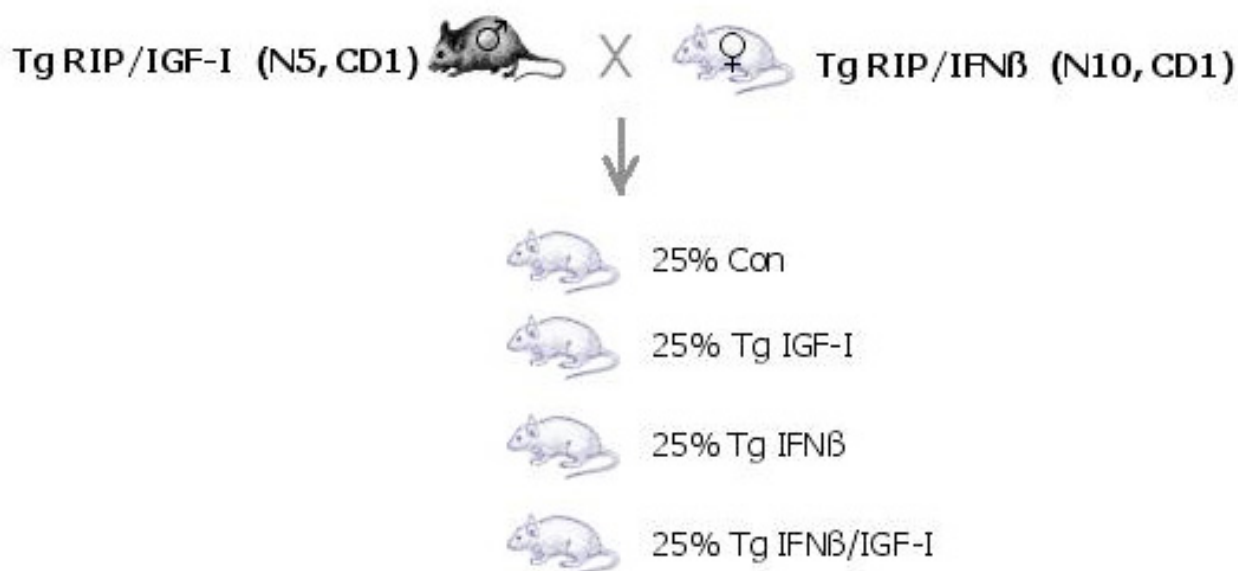
El 100% dels animals desenvolupaven una progressió crònica de la diabetis en tractar amb baixes dosis de STZ, una bona viabilitat i es reproduïen amb normalitat. Tots aquests factors són importants a l'hora d'escollir models tant per l'estudi com per provar noves teràpies per aquesta malaltia. Així doncs, els ratolins transgènics RIP/IFN β podrien constituir un nou model molt adequat de diabetis tipus 1 semblant a la que desenvolupen els humans.

3. OBTENCIÓ D'ANIMALS DOBLES TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN ELS GENS QUIMÈRICS RIP/hIFN β I RIP/IGF-I EN LES CÈL·LULES β PANCREÀTIQUES.

En el nostre laboratori s'havia obtingut una línia de ratolins que expressaven el factor de creixement similar a la insulina 1 (IGF-I) específicament en les cèl·lules β pancreàtiques (RIP/IGF-I). Aquests animals presentaven una recuperació en la massa e cèl·lula β després d'un tractament amb STZ (George, 2002). Per tal de determinar si l'expressió d'IGF-I podia contrarestar la diabetis autoimmune que desenvolupen els ratolins transgènics RIP/hIFN β després del tractament amb STZ, vàrem generar animals dobles transgènics mitjançant l'encreuament d'animals RIP/hIFN β i RIP/IGF-I (IFN β /IGF-I).

3.1. OBTENCIÓ D'ANIMALS DOBLES TRANSGÈNICS IFN β /IGF-I.

Per dur a terme aquest estudi, es van encreuar els ratolins transgènics per hIFN β amb els ratolins transgènics per IGF-I, tots dos congènics amb la soca CD-1. De la primera generació obtinguda se'n van obtenir els quatre genotips:



3.2 ANÀLISI HISTOLÒGICA DELS PÀNCREES DELS RATOLINS DOBLES TRANSGÈNICS IFN β /IGF-I.

En realitzar l'anàlisi histològica dels pàncrees procedents dels animals controls, Tg IGF-I, Tg IFN β i dobles Tg IFN β /IGF-I, es va observar que no hi havia canvis en l'estructura ni en la distribució cel·lular dels illots entre els diferents genotips (Fig. 15). En analitzar immunohistoquímicament l'expressió dels 2 transgens en les cèl·lules β pancreàtiques: hIFN β (Fig. 16A-J) i IGF-I (Fig. 16B-K) es va observar que només en els transgènics era possible detectar la presència de hIFN β i d'IGF-I en els illots pancreàtics. Per altra banda, en analitzar l'expressió de la insulina no es van observar diferències entre els pàncrees controls i transgènics (Fig. 16C-L). A més, es va observar que l'expressió d'hIFN β co-localitzava amb la d'IGF-I (Fig. 16J-K). Aquesta co-localització de la citoquina i l'hormona, era deguda a que la síntesi de totes dues proteïnes estava regulada pel mateix promotor, el promotor del gen de la insulina-I de rata (RIP-I). També es va observar que

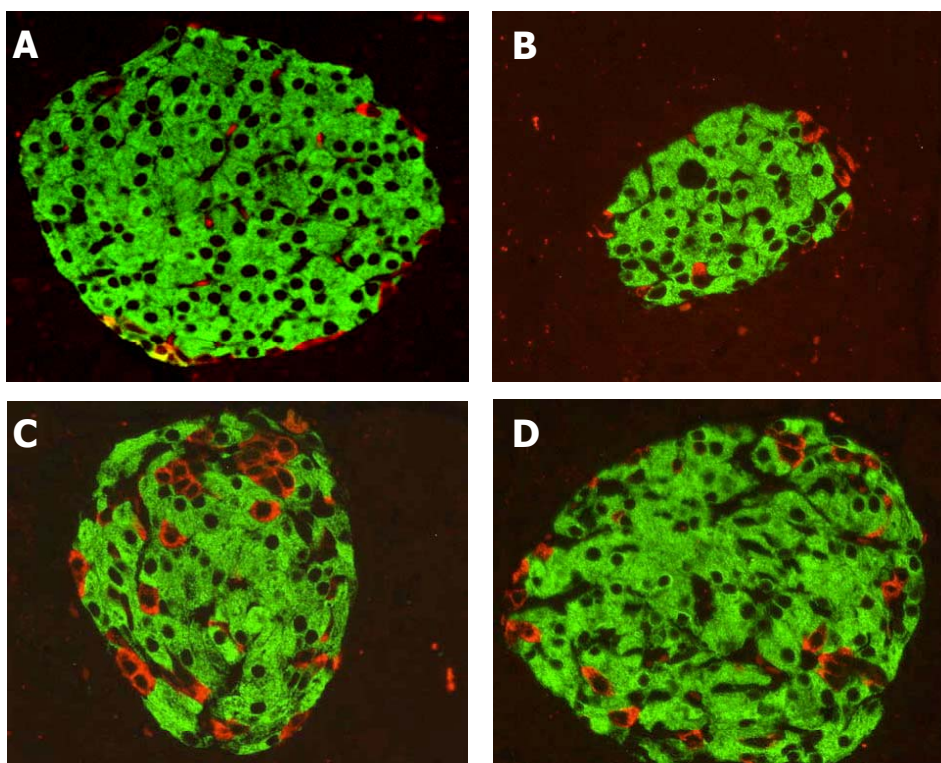


Figura 15. Anàlisi immunohistoquímica dels pàncrees dels ratolins dobles transgènics. Es van fer talls histològics de pàncrees d'animals de 3 mesos d'edat. **(A)** controls, **(B)** transgènics IGF-I, **(C)** transgènics IFN β i **(D)** dobles transgènics IFN β /IGF-I. Es van incubar amb anticossos anti-insulina (verd) i anti-glucagó (vermell), com s'indica en Materials i Mètodes. Amplificació x400.

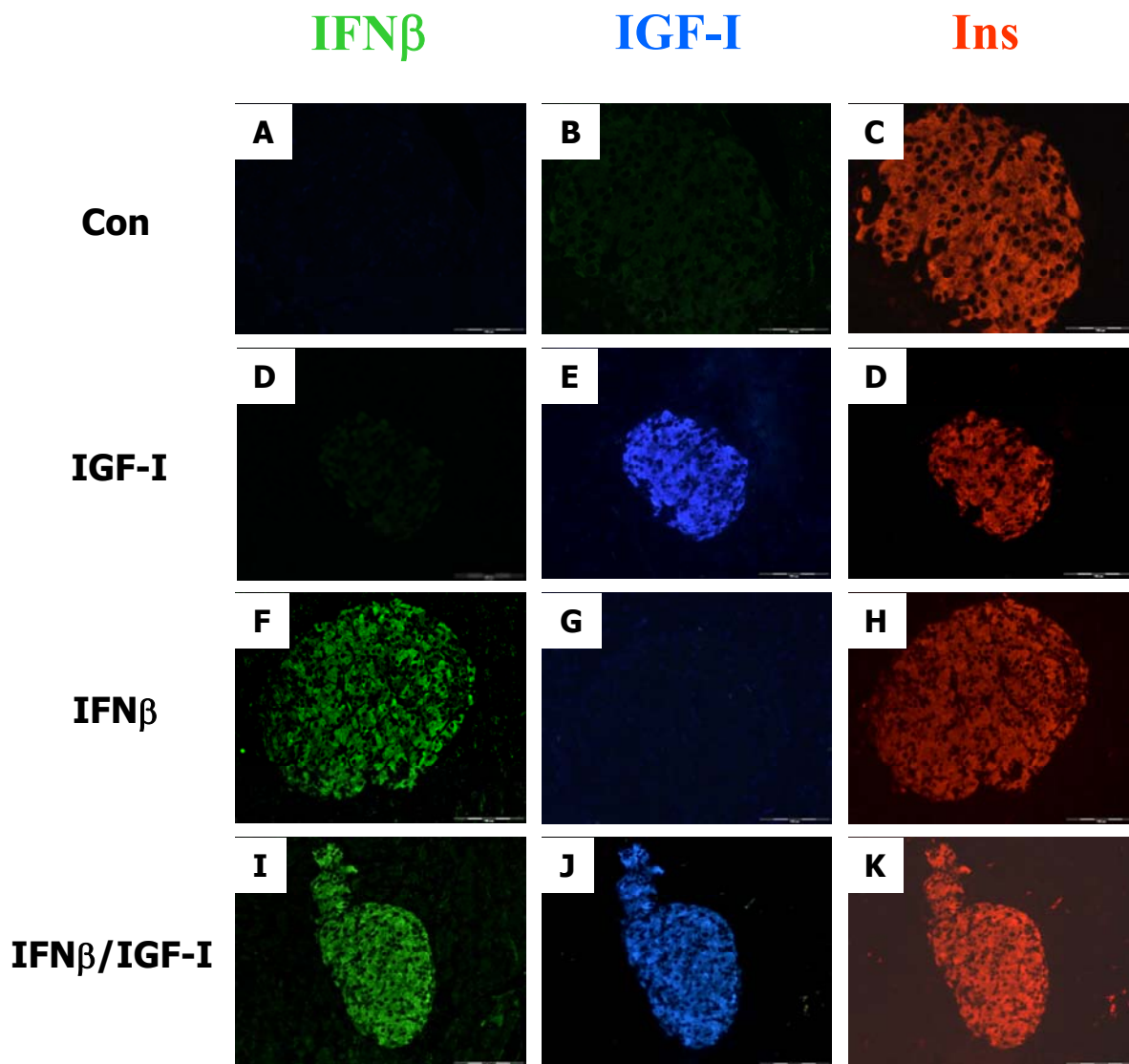


Figura 16. Anàlisi immunohistoquímica del pàncrees dels animals doble transgènics IFN β /IGF-I. Es van realitzar talls histològics de pàncrees procedents de ratolins mascles de 3 mesos d'edat controls (A,B,C), Tg IGF-I (D,E,F), Tg IFN β (G,H,I) i doble transgènics IFN β /IGF-I (J,K,L). Es van incubar amb anticòssos: anti-IFN β (A,D,G,J), anti-IGF-I (B,E,H,K) i anti-insulina (C,F,I,L). Ampliació x200.

3.3. ANÀLISI DEL GRAU D'INSULITIS EN RATOLINS DOBLES TRANSGÈNICS IFN β /IGF-I.

A continuació es va determinar el grau d'insulitis dels ratolins controls, Tg IGF-I, Tg IFN β i dobles Tg IFN β /IGF-I als 3 mesos d'edat. Per això, es van sacrificar els animals i posteriorment es va realitzar un estudi histològic del pàncrees. Així, es va observar que mentre que els ratolins controls i Tg IGF-I, presentaven pràcticament el 100% dels illots sense infiltració, els ratolins Tg IFN β presentaven al voltant del 35% dels illots infiltrats en diferent grau (Fig. 17). Pel contrari, els ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I mostraven un grau d'infiltració similar al dels seus germans controls i Tg IGF-I. Per tant, el fet d'expressar IGF-I protegia aquests animals de l'atac autoimmune induït per l'expressió d'IFN β (Fig. 17).

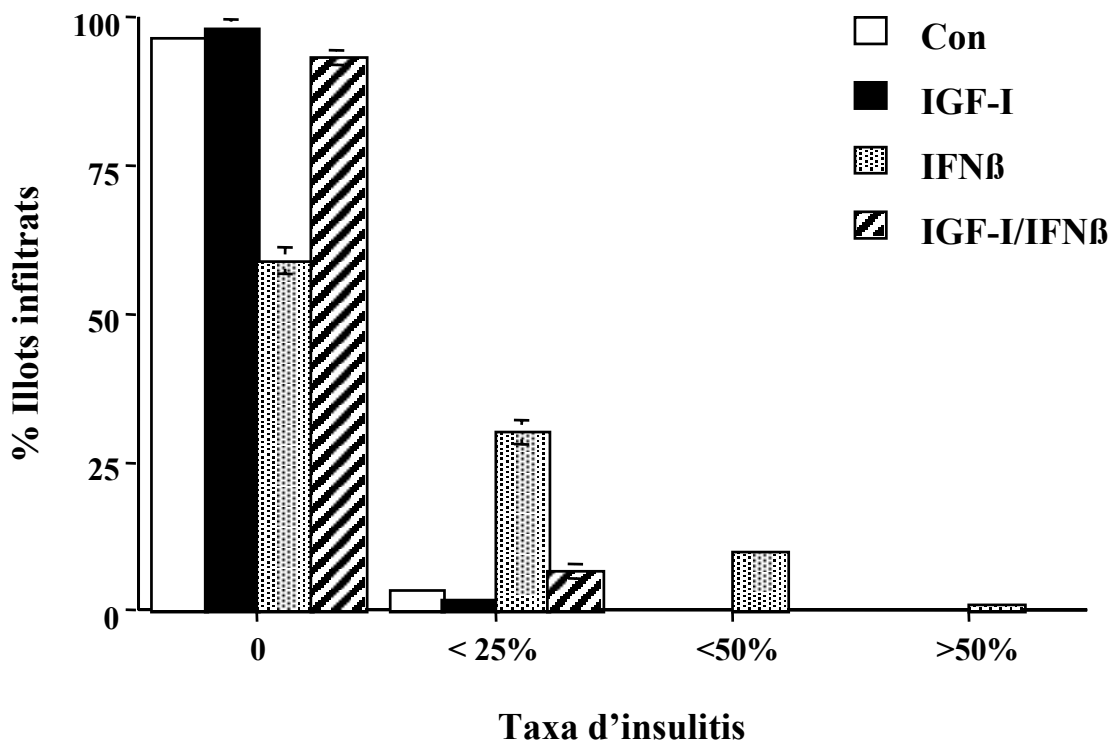


Figura 17. Anàlisi del grau d'insulitis en pàncrees d'animals dobles transgènics IFN β /IGF-I. Es van sacrificar ratolins mascles controls, Tg IGF-I, Tg IFN β i dobles transgènics IFN β /IGF-I de 3 mesos d'edat. Es va analitzar el grau d'infiltració limfocitària en talls histològics de pàncrees tractats amb un anticòs anti-insulina, tal i com s'indica en l'apartat de Materials i Mètodes. Es van analitzar més de 250 illots per pàncrees i 3 animals per grup. Els resultats són la mitja \pm SEM.

3.4. ESTUDI DEL TRACTAMENT AMB ELEVADES DOSIS DE STZ D'ANIMALS DOBLES TRANSGÈNICS IFN β /IGF-I.

Amb l'objectiu de determinar si IGF-I era capaç de protegir els animals que expressen IFN β en front l'atac autoimmune induït pel tractament amb STZ, es va procedir a la injecció de dosis múltiples de STZ en la primera generació d'animals obtinguts en els encreuaments entre Tg IFN β i Tg IGF-I. Així, es van tractar animals mascles de 2 mesos d'edat (controls, transgènics IFN β i IGF-I, i dobles transgènics IFN β /IGF-I) amb 5 dosis consecutives de 30 mg de STZ/kg. A continuació es va realitzar el seguiment de la glicèmia durant 4 mesos.

Els ratolins controls presentaven hiperglicèmia al mes de ser tractats, tot i que els valors que varen assolir eren de 400 mg/dl, posteriorment es varen mantenir al voltant de 300 mg/dl en tot l'estudi (Fig. 18A). En canvi, els ratolins Tg IGF-I tractats amb STZ, mostraven un pic de al voltant de 250 mg/dl al 15 dies després del tractament i posteriorment varen romandre normoglicèmics durant tot l'estudi (Fig. 18A). Així, el fet d'expressar IGF-I en la cèl·lula β , protegia aquests animals de desenvolupar hiperglicèmia causada pel tractament amb 30 mg STZ. Per contra, els ratolins Tg IFN β al cap de 10 dies d'iniciar el tractament, ja presentaven valors de glicèmia de 450 mg/dl, i al mes presentaven valors de glicèmia superiors al del límit de detecció de l'aparell (Fig. 18A). En canvi, es va observar que els ratolins dobles transgènics Tg IFN β /IGF-I responien de diferent manera i es podien distingir 3 poblacions. Un 37,5% dels animals (grup C), mostraven el mateix fenotip que els seus germans Tg IFN β , ja que presentaven una marcada hiperglicèmia (Fig. 18B). Un 37,5% (grup B), tot i presentar hiperglicèmia, mai assolien els valors tan elevats del grup anterior i mantenien uns valors de glicèmia semblant a la dels ratolins controls tractats amb STZ (Fig. 18A). Per últim, un 25% dels animals dobles transgènics (grup A), no desenvolupava hiperglicèmia i es comportava com els seus germans Tg IGF-I, (Fig. 18B). Així doncs, un 25% dels animals dobles transgènics IFN β /IGF-I semblaven ser capaços de revertir completament la hiperglicèmia diabètica.

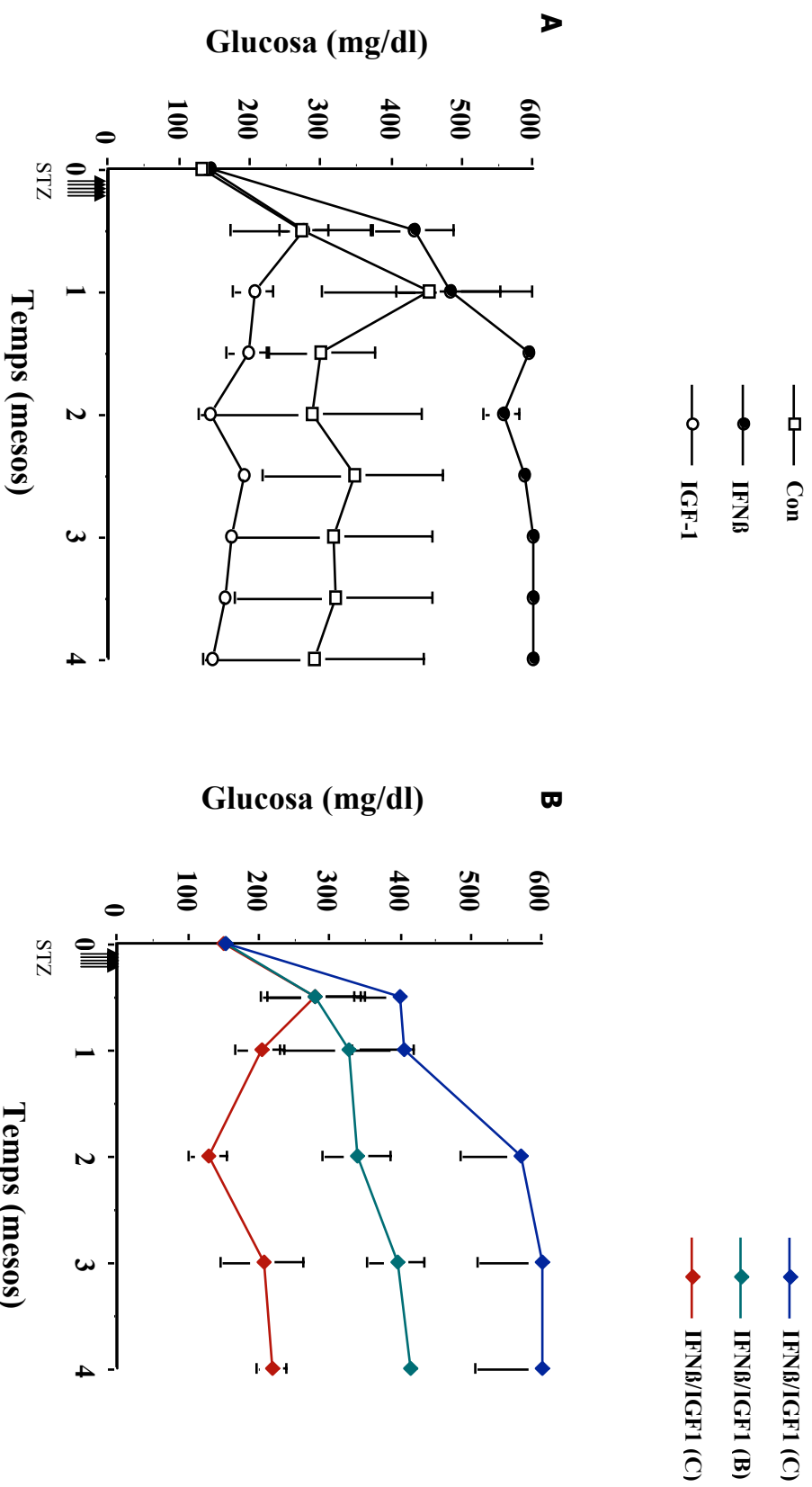


Figura 18. Evolució de la glucèmia després del tractament amb estreptozotocina. Es varen injectar intraperitonealment 30 mg de STZ/kg durant 5 dies consecutius, a ratolins controls i transgènics. Posteriorment es va fer un seguiment de la glucèmia de tots els animals durant 4 mesos. Els valors són la mitja \pm SEM. Es van utilitzar 5 animals control, 13 animals Tg IGF-1, 10 Tg IFN β i 8 animals dobles Tg IFN β /IGF-1.

3.4.1. Determinació dels nivells de glucosa basal.

Per valorar els efectes del tractament amb STZ sobre els nivells basals de glucosa, es va procedir a determinar-ne la concentració al cap de 3.5 mesos d'haver iniciat l'estudi. Així, es va determinar la glicèmia després de 16 hores de dejuni i es va observar que els ratolins Tg IGF-I, presentaven valors normoglicèmics, similars als valors que presentaven els ratolins controls (Fig. 19). En canvi, els ratolins Tg IFN β presentaven una marcada hiperglicèmia basal. Pel contrari, els ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I del grup A presentaven una restauració de la glucosa basal que arribava a valors normals d'aproximadament 80 mg/dl, i els del grup (B) mostraven un lleuger increment de la glicèmia basal respecte els valors del grup A, però es mantenien dins de la normalitat (Fig. 19).

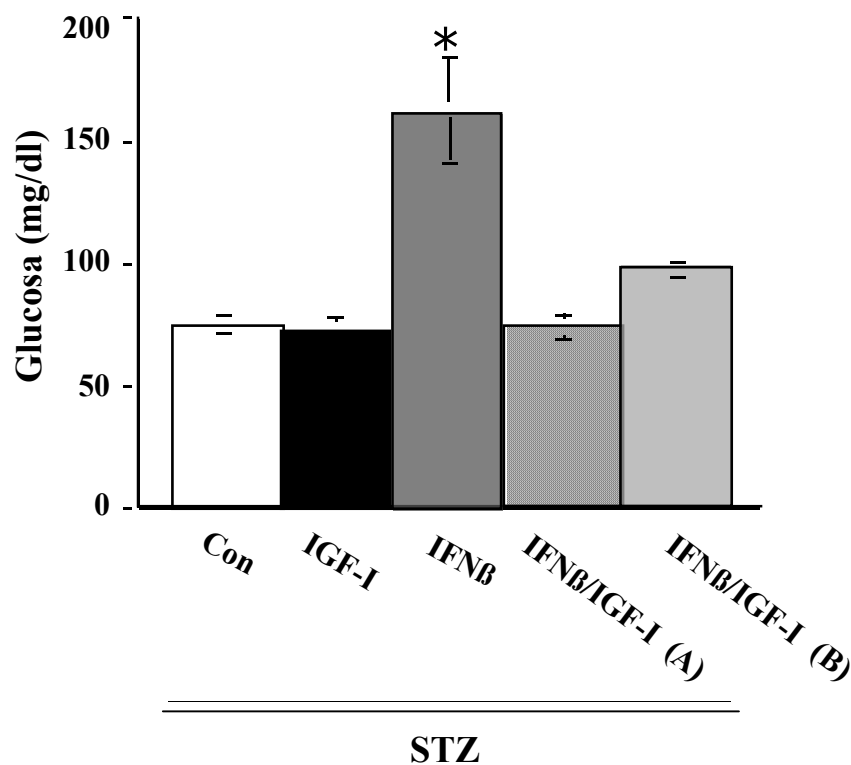


Figura 19. Valors de glicèmia en dejú. Al cap de 3.5 mesos de tractament es va mesurar la glicèmia després de 8 hores de dejuni. La gràfica representa la mitjana \pm SEM de n= 5 controls, n= 13 tg IGF-I, n=4 tg IFN β i n=6 tg IFN β +IGF-I.

3.4.2. Determinació dels nivells d'insulina.

Per valorar els efectes del tractament amb STZ sobre els nivells circulants d'insulina, es va procedir a determinar-ne la concentració després de 4 mesos d'haver iniciat l'estudi. Així, es va observar que els ratolins alimentats controls i Tg IGF-I, presentaven valors normoinsulinèmics (Fig. 20). Els ratolins Tg IFN β presentaven hipoinsulinèmia, resultat que concordava amb la hiperglicèmia basal que s'observava en aquest animals.

Pel contrari, els ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I del grup A recuperaven els valors d'insulinèmia fins assolir els valors dels animals controls i Tg IGF-I, mentre que els dobles Tg del grup B mostraven una disminució dels nivells d'insulinèmia del voltant del 45 % que estava d'acord amb la hiperglicèmia que es detectava en aquest grup d'animals (Fig. 20).

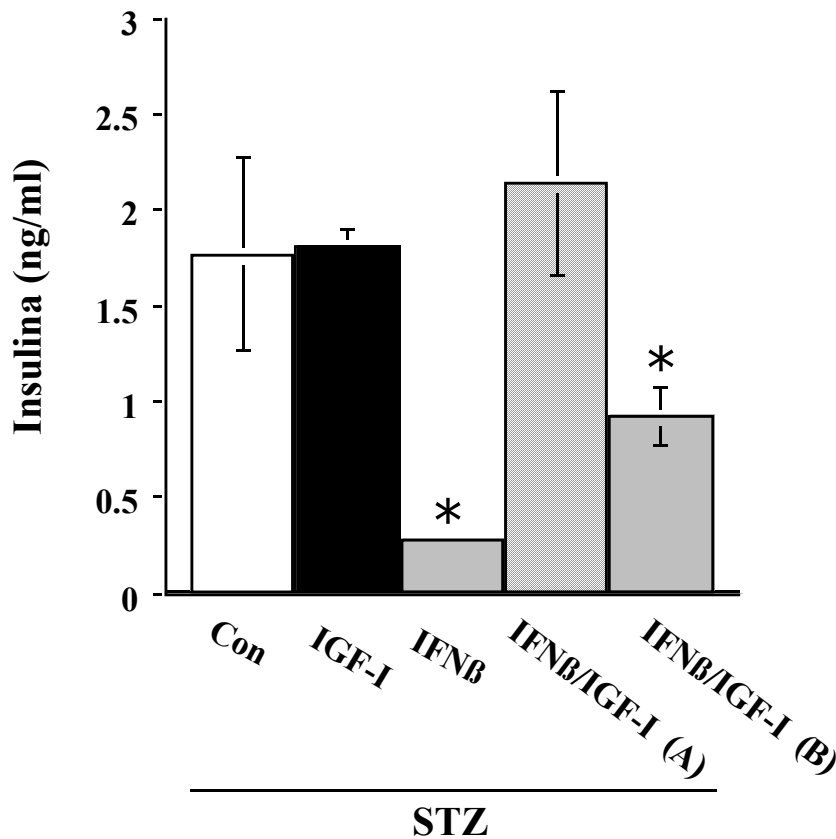


Figura 20. Nivells d'insulinèmia. Es va determinar la concentració d'insulina en sèrum després de 4 mesos de tractament amb STZ. La gràfica representa la mitjana \pm SEM de n= 5 controls, n= 13 tg IGF-I, n=4 tg IFN β , n=4 tg IFN β /IGF-I (B) i n=2 tg IFN β /IGF-I (A).

3.4.3. Test de tolerància a la glucosa.

Una de les característiques de la diabetis tipus 1 és la alteració de la tolerància a la glucosa. Així, s'ha descrit que individus diabètics presenten intolerància a la sobre-càrrega de glucosa. Es va procedir a la realització d'un test de tolerància a la glucosa en aquests animals, amb la finalitat de determinar si eren capaços de restablir la glicèmia amb igual eficàcia que els animals controls i Tg IGF-I.

El test es va realitzar després de 3.5 mesos del tractament amb STZ. En primer lloc, es va mesurar la glicèmia basal, temps 0, després d'un dejuni d'unes 12 hores. Immediatament

després, vam administrar intraperitonealment una càrrega de glucosa de 1 mg/g de pes, i es va dur a terme el seguiment de la glicèmia durant 3 hores. Els animals transgènics IFN β , assolien un pic de glicèmia de 400 mg/dl a la mitja hora d'haver iniciat el test, i mantenien valors per sobre de 250 mg/dl durant tot l'experiment (Fig. 21). Per contra, els tres grups restants, animals controls, transgènics IGF-I i dobles transgènics (grup A, normoglicèmics i grup B, lleugerament hiperglicèmics), mai assolien valors tan elevats i arribaven a un pic màxim de 350 mg/dl a la mitja hora d'haver iniciat el test. Ràpidament la glicèmia disminuïa a mesura que avançava el temps, fins arribar a valors normals al final de l'experiment. Així doncs, els ratolins dobles transgènics dels grups A+B eren capaços de comportar-se com els seus germans controls i Tg IGF-I, mostrant una millor tolerància a la glucosa que els transgènics IFN β , que eren totalment intolerants (Fig. 21).

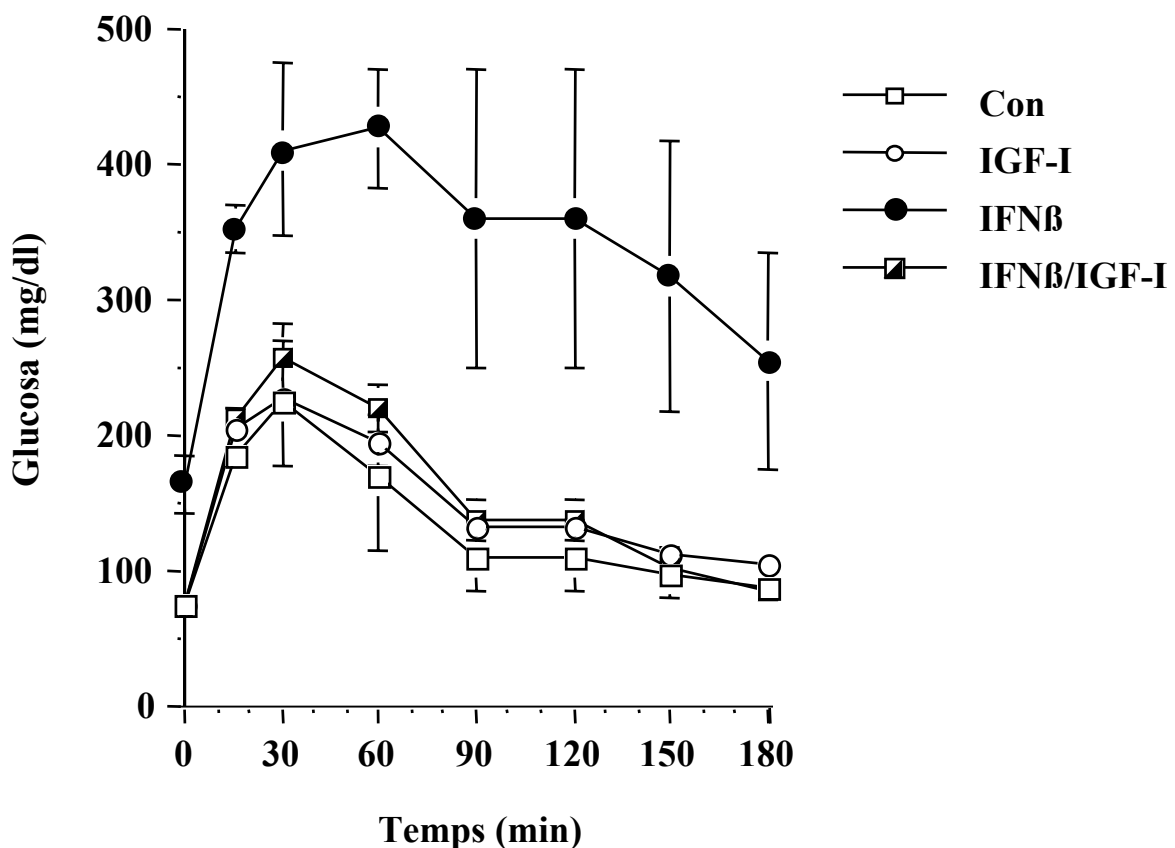


Figura 21. Test de tolerància a la glucosa després del tractament amb STZ (A). Es va administrar glucosa (1 mg/g pes) intraperitonealment després de 8 hores de dejuni. El seguiment de la glicèmia es va realitzar cada 30 minuts. Els resultats són la mitjana \pm SEM de n= 5 controls, n= 13 Tg IGF-I, n=4 Tg IFN β i n=6 Tg IFN β /IGF-I.

3.4.4. Anàlisi de la viabilitat dels ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I després del tractament amb 30 mg de STZ.

Un dels signes més evidents de que els ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I reaccionaven millor al tractament amb 30 mg de STZ respecte els seus germans Tg IFN β , es va observar quan s'anализava la viabilitat d'aquests animals (Fig. 22). Així, tot i ser lleugerament hiperglicèmics el 100% dels ratolins controls sobreviuen al tractament amb STZ. Similarment, la totalitat dels ratolins IGF-I sobreviuen al tractament. Per contra, la taxa de supervivència dels animals Tg IFN β disminuïa fins a un 55% i es mantenia fins finalitzar l'estudi (Fig. 22). En canvi, només el 25% dels animals dobles transgènics IFN β /IGF-I havien mort al finalitzar l'estudi. Per tant, el fet de co-expressar IGF-I, protegia als animals Tg IFN β a desenvolupar diabetis oberta que portaria a la mort de l'animal (Fig. 22).

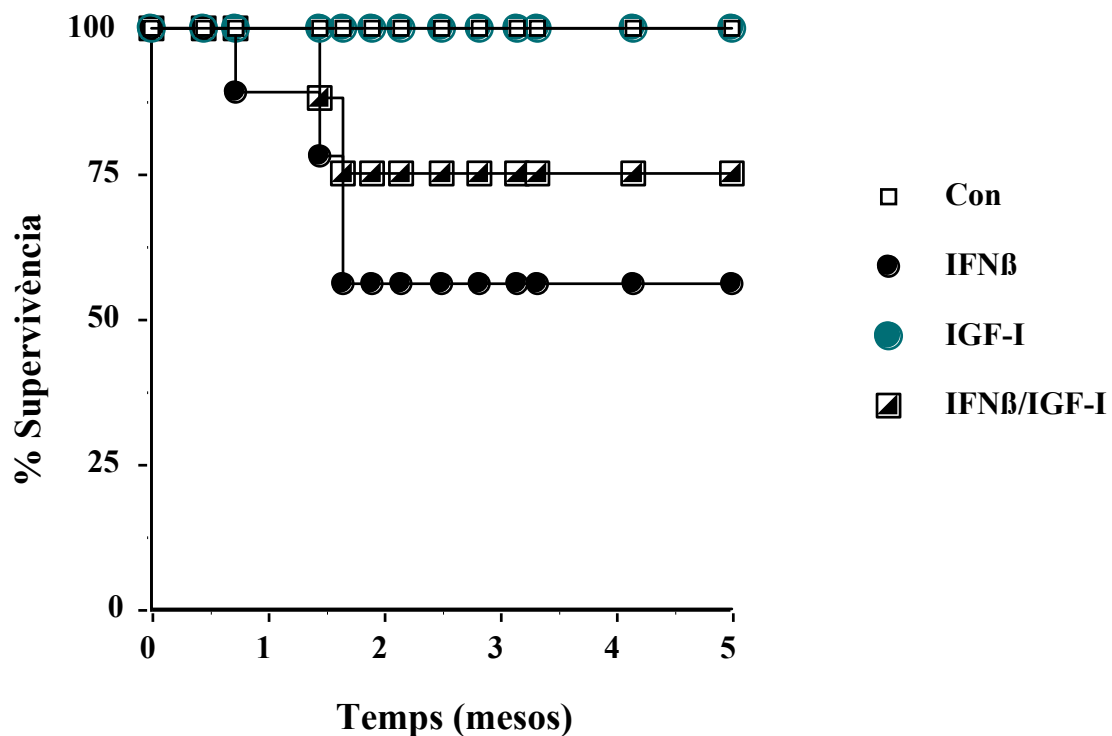


Figura 22. Estudi a llarg terme de la taxa de supervivència després del tractament amb 5 dosis de 30 mg/Kg de STZ. Resultats obtingut d'utilitzar 5 animals controls, 13 animals Tg IGF-I, 10 Tg IFN β i 8 animals dobles Tg IFN β /IGF-I.

3.4.5. Anàlisi histològica dels pàncrees dels ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I després del tractament amb dosis de 30 mg de STZ.

En realitzar un estudi histològic dels pàncrees dels animals controls, Tg IGF-I, Tg IFN β i dobles Tg IFN β /IGF-I després de 4 mesos del tractament amb dosis de 30 mg/kg de STZ es van poder detectar

alteracions morfològiques en els illots (Fig. 23). Els pàncrees dels ratolins controls presentaven desestructuració en la distribució de les cèl·lules de l'illot, les cèl·lules α es trobaven entremig de les cèl·lules β al centre d'aquest (Fig. 23). En canvi, els ratolins Tg IGF-I presentaven una morfologia i distribució normal de les cèl·lules α i β , amb les cèl·lules positives per insulina, situades al centre i cèl·lules α situades a la perifèria de l'illot (Fig. 23). Per contra, els illots dels ratolins Tg IFN β presentaven una marcada disminució de cèl·lules positives per insulina i una desestructuració de les cèl·lules α (Fig. 23). Mentre que, en els illots dels ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I s'observava una lleugera disminució del nombre de cèl·lules positives per insulina, i una marcada alteració en la distribució de les cèl·lules α , que deixaven de situar-se únicament a la perifèria de l'illot per distribuir-se també en el seu interior (Fig. 23).

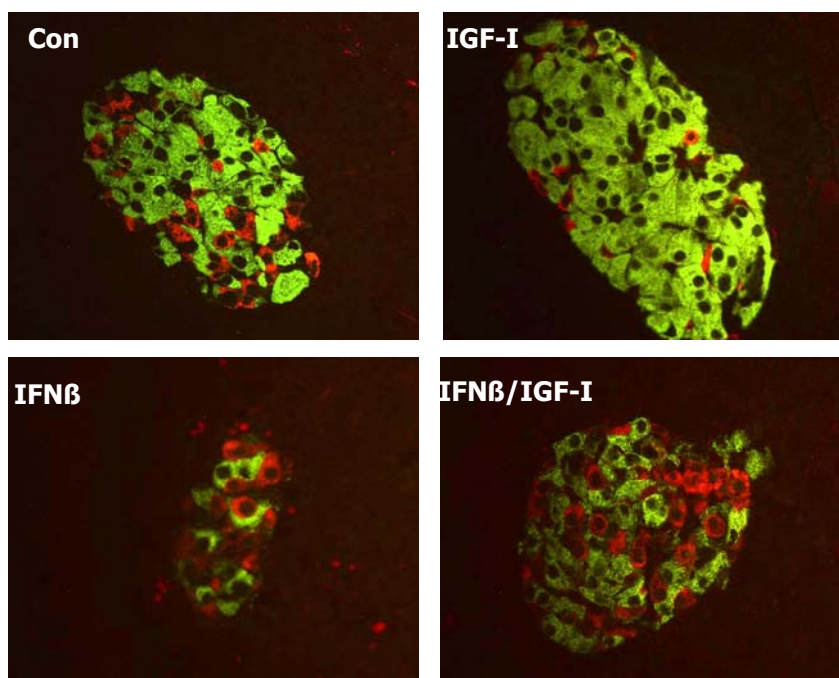


Figura 23. Anàlisi histològica del pàncrees dels animals dobles transgènics IFN β /IGF-I, després del tractament amb 30 mg de STZ. Es van fer talls histològics de pàncrees d'animals després de 4 mesos de tractament amb 30 mg de STZ controls, transgènics IGF-I, transgènics IFN β i dobles transgènics IFN β /IGF-I. Es van incubar amb anticossos anti-insulina (verd) i anti-glucagó (vermell), com s'indica en Materials i Mètodes. Amplificació x400.

3.5. ESTUDI DE L'EFECTE DEL TRACTAMENT AMB DOSIS DE 20 mg/kg DE STZ EN ANIMALS DOBLES TRANSGÈNICS IFN β /IGF-I.

Donat que una part dels ratolins dobles transgènics era capaç de contrarestar l'efecte de dosis múltiples de 30 mg/Kg es va determinar si IGF-I era capaç de protegir o revertir el procés autoimmune observat en els ratolins IFN β després del tractament amb dosis més baixes, no tan tòxiques i més immunoestimuladores de STZ. Per això, es va procedir a realitzar la injecció de dosis múltiples de 20 mg/Kg de STZ en la primera generació d'animals obtinguts en

els encreuaments entre Tg IFN β i Tg IGF-I. Així, es van tractar animals mascles de 2 mesos d'edat (controls, transgènics IFN β i IGF-I, i dobles transgènics IFN β /IGF-I) amb 20 mg de STZ/kg de pes durant 5 dies consecutius. Posteriorment, es va fer el seguiment de la glicèmia en tots els 4 grups durant 4 mesos. L'administració intraperitoneal de 20 mg de STZ/kg pes en els animals controls no provocava cap canvi observable en els valors de glicèmia, que es mantenia dins els nivells normals durant tot l'experiment (Fig. 24). Els animals transgènics IGF-I tractats amb 20 mg STZ/kg, similarmet als seus germans controls, no presentaven un augment de la glicèmia durant tot l'estudi (Fig. 24). Per contra, els ratolins transgènics IFN β mostraven un increment progressiu dels valors de glucosa circulants. Així, al cap de 2 mesos d'haver iniciat el tractament presentaven una evident hiperglicèmia (>400mg/dl), que augmentava fins assolir valors quasi al límit de detecció de l'aparell al final de l'experiment. D'altra banda, els ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I no presentaven un increment de la glicèmia i els seu comportament era similar al dels ratolins Tg IGF-I (Fig. 24). Així doncs, l'expressió d'IGF-I protegia als ratolins IFN β a desenvolupar hiperglicèmia crònica.

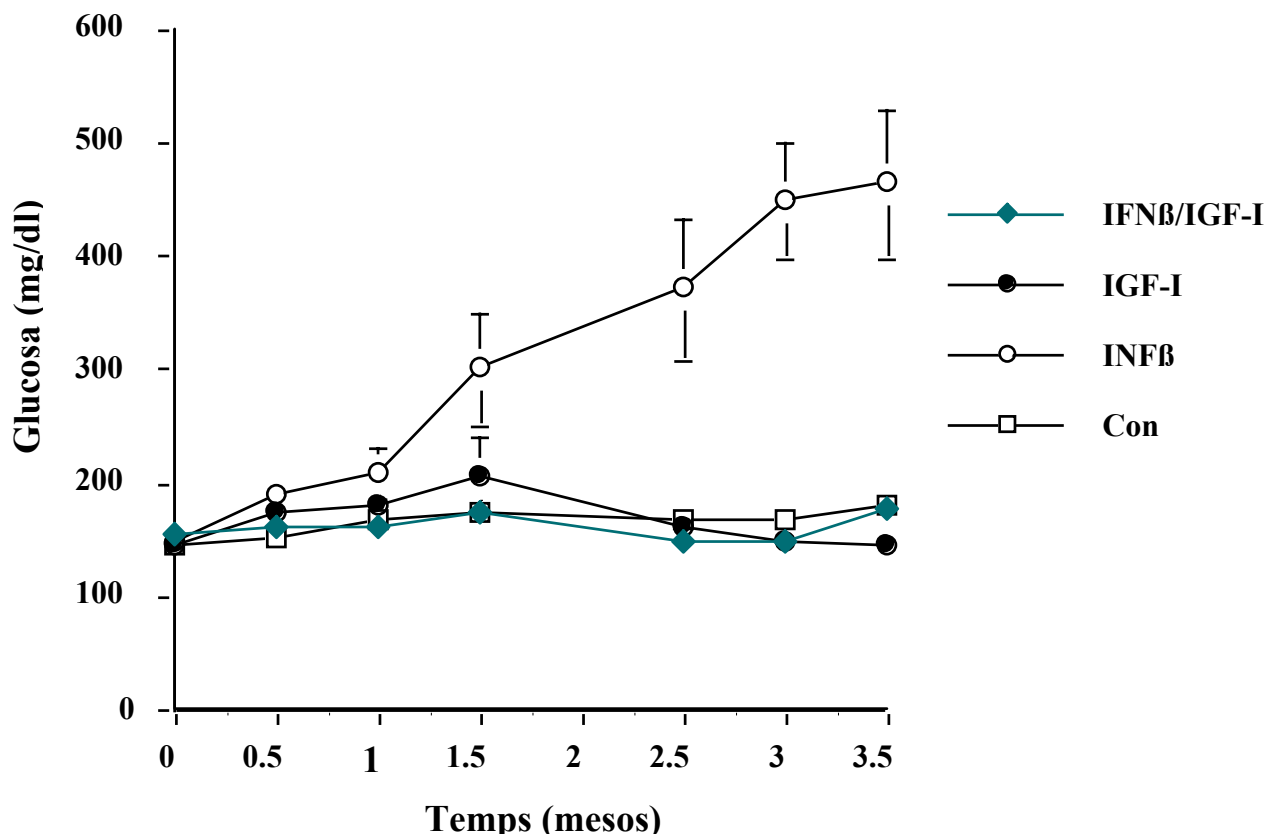


Figura 24. Evolució de la glicèmia dels ratolins controls, transgènics i dobles transgènics tractats amb múltiples dosis de 20 mg/Kg de STZ. Es varen injectar intraperitonealment 20 mg de STZ/kg de pes viu a ratolins controls i transgènics durant 5 dies consecutius. Posteriorment, es va fer un seguiment de la glicèmia de tots els animals durant 4 mesos. Els valors són la mitja \pm SEM de 11 animals controls, 6 animals Tg IGF-I, 7 animals Tg IFN β i 13 dobles Tg IFN β /IGF-I.

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.

A continuació, després del tractament amb STZ vam estudiar si el fet de coexpressar IGF-I protegia als illots de la invasió de cèl·lules immunitàries. Així doncs, després de 3,5 mesos d'haver iniciat el tractament, es van sacrificar animals controls, transgènics IGF-I i IFN β , i dobles transgènics IFN β /IGF-I. Un cop realitzades les necròpsies, els pàncrees es van incloure i tot seguit es va procedir a l'estudi immunohistoquímic amb un anticòs contra la insulina. Quan s'analizaven els talls histològics dels animals sacrificats es podia observar que tant els ratolins controls com els ratolins transgènics per IGF-I tractats amb STZ, presentaven pràcticament el 100% dels illots sense infiltració (Fig. 25). Per contra, els ratolins transgènics IFN β tractats amb STZ, de la mateixa manera que en l'estudi anterior, el 85% dels seus illots estaven infiltrats en diferent grau (Fig. 25). Encanvi, els animals dobles transgènics IFN β /IGF-I no presentaven pràcticament inflamació. Gairebé el 100% dels illots no estaven infiltrats i només un 10% d'ells presentava una lleugera periinsulitis (Fig. 25). Això coincidia amb els resultats obtinguts en l'anàlisi histològica dels pàncrees d'animals sense tractar (Fig. 17). Aquests resultats també estaven d'acord amb els valors de glicèmia observats anteriorment que feien pensar que les cèl·lules β no havien estat destruïdes. Així doncs, l'expressió d'IGF-I protegia als ratolins Tg IFN β de l'atac immunitari sobre els seus illots.

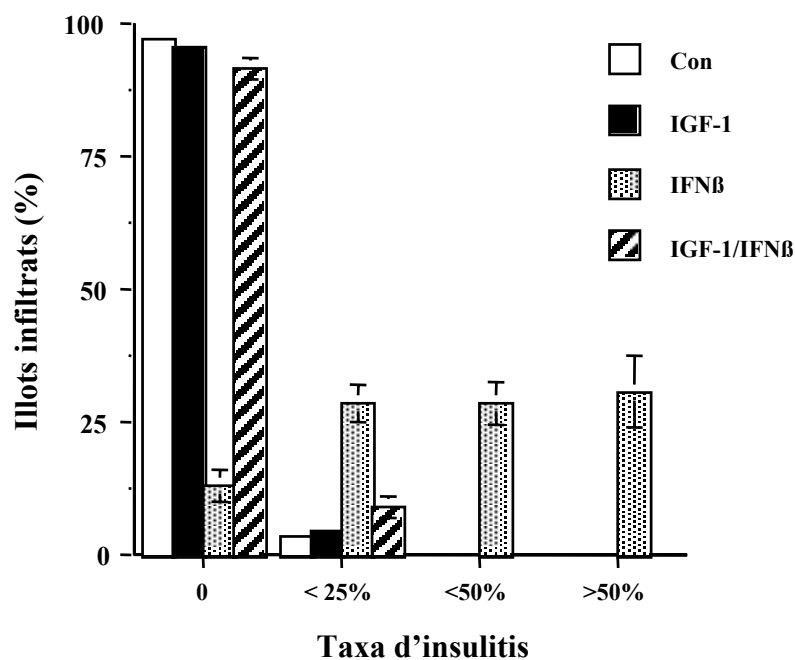


Figura 25. Anàlisi del grau d'infiltració (insulitis) en ratolins després del tractament amb 20 mg de STZ. Després de 4 mesos de tractament amb STZ, es van sacrificar els animals i posteriorment se'n van analitzar les lesions pancreàtiques. Els resultats són la mitja \pm SEM, i de 4 animals per grup.

3.5.2. Determinació dels nivells circulants d'insulina.

Es va determinar la insulinèmia per radioimmunoassaig en mostres de sèrum procedents de ratolins de 6 mesos d'edat sense tractar, i en mostres procedents de ratolins després de 4 mesos de tractament. Quan s'analitzaven els nivells circulants d'insulina en les mostres procedents d'animals dels 4 grups sense tractar, s'observaven valors normals d'insulina circulant (Fig. 26). Pel que fa al grup tractat amb 20 mg de STZ/kg de pes, s'observava que els ratolins controls presentaven una lleugera disminució al voltant del 20% després de 4 mesos de tractament, però es mantenien dins la normalitat (Fig. 26). Això coincidia amb la disminució de la insulinèmia observada en l'estudi anterior (Fig. 10), i no va ser suficient per afectar a la seva glicèmia. En canvi, en els ratolins Tg IGF-I no es detectava cap alteració significativa en la seva insulinèmia després del tractament (Fig. 26). Per contra, s'observava una dràstica disminució dels nivells circulants de insulina de fins al voltant del 90 % dels valors inicials en els ratolins Tg IFN β (Fig. 26). Això estaria d'acord amb els resultats obtinguts en la glicèmia i amb la taxa d'infiltració pancreàtica d'aquests animals. En canvi, els ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I mantenien la normoinsulinèmia després de 4 mesos de tractament (Fig. 26). Per tant, aquests resultats indicaven que l'expressió d'IGF-I evitava la disminució de la insulina circulant tant en els ratolins Tg IGF-I com en els ratolins Tg IFN β /IGF-I, provocada pel tractament amb STZ, molt probablement perquè es mantenia la massa de cèl·lula β amb la capacitat normal de secretar insulina.

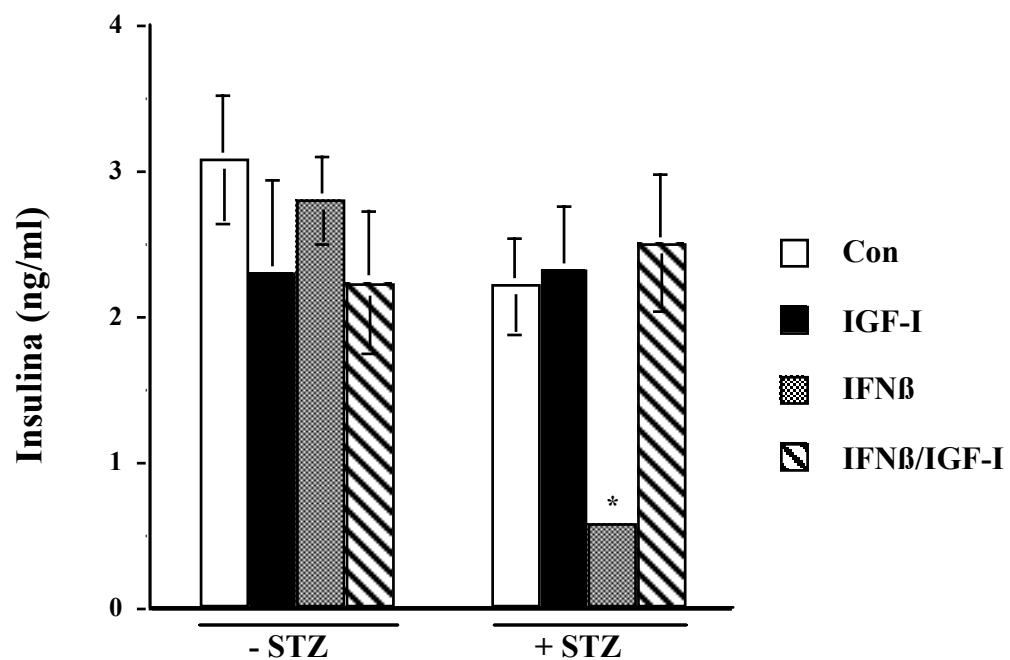


Figura 26. Nivells d'insulina en animals tractats amb STZ. Valors d'insulinèmia en animals controls, transgènics i dobles transgènics alimentats després de 4 mesos del tractament. Els resultats són la mitja \pm SEM de 5 animals per grup sense tractar, i 11 animals controls, 6 animals Tg IGF-I, 7 animals Tg IFN β i 13 dobles Tg IFN β /IGF-I tractats amb STZ.

3.5.3. Anàlisi morfològica dels pàncrees procedents dels ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I.

Amb la finalitat de determinar si el manteniment de la insulinèmia en els ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I tractats amb STZ, coincidia també amb una recuperació de la massa de cèl·lula β , es va procedir a realitzar l'anàlisi morfològica d'aquests pàncrees. En analitzar els pàncrees d'animals sense tractar, similarment al que s'observava a les insulinèmies, no es detectaven diferències entre els quatre grups experimentals (Fig. 27A). D'altra banda, quan s'analitzaven els pàncrees dels animals tractats amb STZ s'observava una lleugera disminució al voltant del 20% en els ratolins controls (Fig. 27A). Aquest resultat coincidia amb la petita disminució observada en la insulinèmia d'aquests ratolins, però no provocava cap alteració en la glicèmia. També s'observava que els ratolins Tg IGF-I estaven protegits contra la pèrdua de massa de cèl·lula β (Fig. 27A), tal i com ja s'havia detectat en estudis anteriors (George, 2002). Per contra, els ratolins Tg IFN β presentaven una marcada disminució de fins un 88% en la massa de cèl·lula β (Fig. 27A), que estava d'acord amb la hiperglicèmia i la hipoinsulinèmia observada en aquests animals. En canvi, els ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I no mostraven una disminució en la seva massa de cèl·lula β . Per tant, això indicava que l'expressió de IGF-I protegia als ratolins Tg IFN β /IGF-I de la pèrdua de massa de cèl·lules β (Fig. 27A).

Paral·lelament, es va examinar el contingut pancreàtic d'insulina en els pàncrees dels animals sotmesos a estudi. Els ratolins controls tractats amb STZ presentaven una reducció del 40% en el contingut d'insulina (Fig. 27B), que estava d'acord amb la reducció en la massa de cèl·lula β d'aquests animals. Quan s'analitzaven els ratolins Tg IGF-I tractats amb STZ no s'observaven diferències significatives del contingut pancreàtic d'insulina respecte els valors inicials (Fig. 27B). Al contrari, els ratolins Tg IFN β mostraven una reducció d'aproximadament el 90%, valors que coincidien amb la pèrdua observada en la massa de cèl·lula β . En canvi, els ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I presentaven una recuperació del contingut d'insulina pancreàtic respecte els seus germans IFN β . Així doncs, l'expressió d'IGF-I a més de protegir contra la pèrdua de massa de cèl·lula β , també recuperava el contingut d'insulina pancreàtic (Fig. 27B).

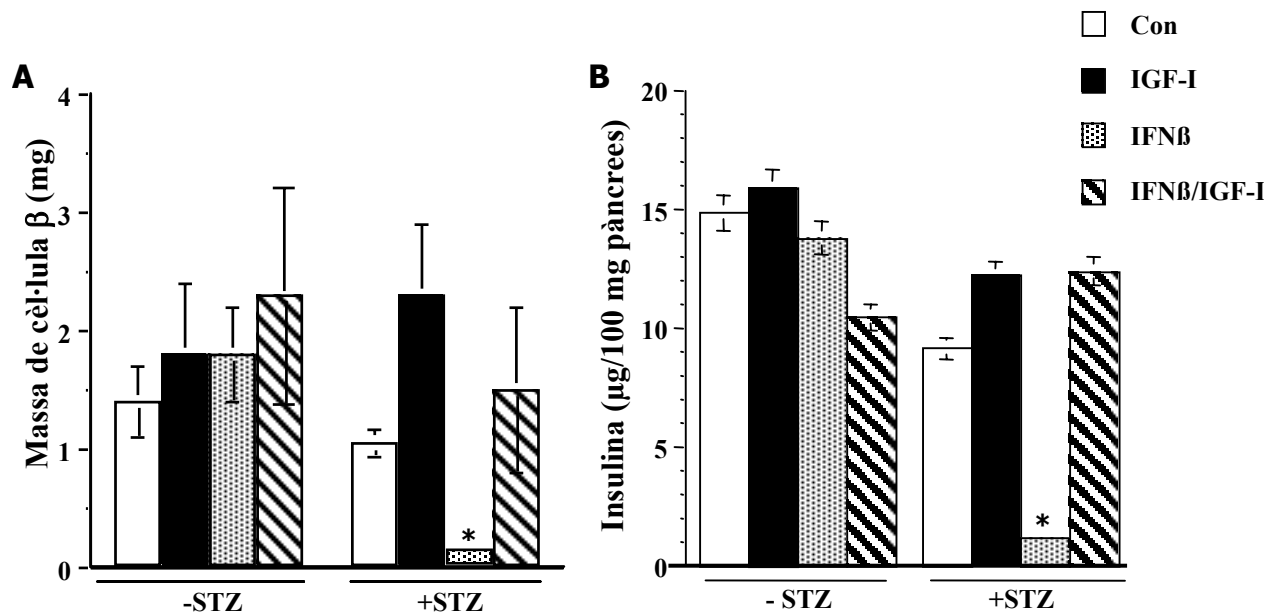


Figura 27. Anàlisi morfomètric i contingut pancreàtic en animals tractats amb estreptozotocina. Pàncrees d'animals controls i transgènics tractats i sense tractar amb STZ després de 4 mesos d'haver iniciat l'estudi. (A) Es va determinar la massa de cèl·lula β en els 4 grups controls i transgènics tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els valors representen la mitja \pm SEM de 3 controls i 3 transgènics. (B) Contingut d'insulina en pàncrees controls i transgènics, procedents d'animals sense tractar i d'animals tractats amb dosis de 20 mg STZ/kg. Els valors representen la mitja \pm SEM de 7 controls, 7 transgènics IFN β i IGF-I, i 7 dobles transgènics IFN β /IGF-I.

3.5.4. Anàlisi histològica dels pàncrees procedents de ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I després del tractament amb 20 mg de STZ.

Donat que els ratolins dobles transgènics no presentaven una pèrdua de la massa de cèl·lula β , es va realitzar l'anàlisi histològica d'aquests pàncrees per determinar si hi havia una alteració en la morfologia i distribució de les seves cèl·lules. Així, després de 4 mesos de tractament amb 20 mg/kg de STZ es va realitzar l'anàlisi immunohistoquímica amb anticossos anti-insulina i anti-glucagó. Quan s'examinaven els pàncrees dels ratolins controls s'observava que no hi havia cap tipus d'alteració ni en la morfologia ni en la distribució de les cèl·lules del illot (Fig. 28). Similarment els pàncrees dels ratolins Tg IGF-I després del tractament, presentaven una distribució normal de les cèl·lules del illot (Fig. 28). Al contrari, en els ratolins Tg IFN β s'observava una marcada disminució de cèl·lules positives per insulina i la presència de cèl·lules positives per glucagó al interior de l'illot (Fig. 28). En canvi, els ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I presentaven una marcada alteració de la distribució de les cèl·lules α (Fig. 28), similarment com quan eren tractats amb 30 mg/kg de STZ, però no tan marcada (Fig. 21).

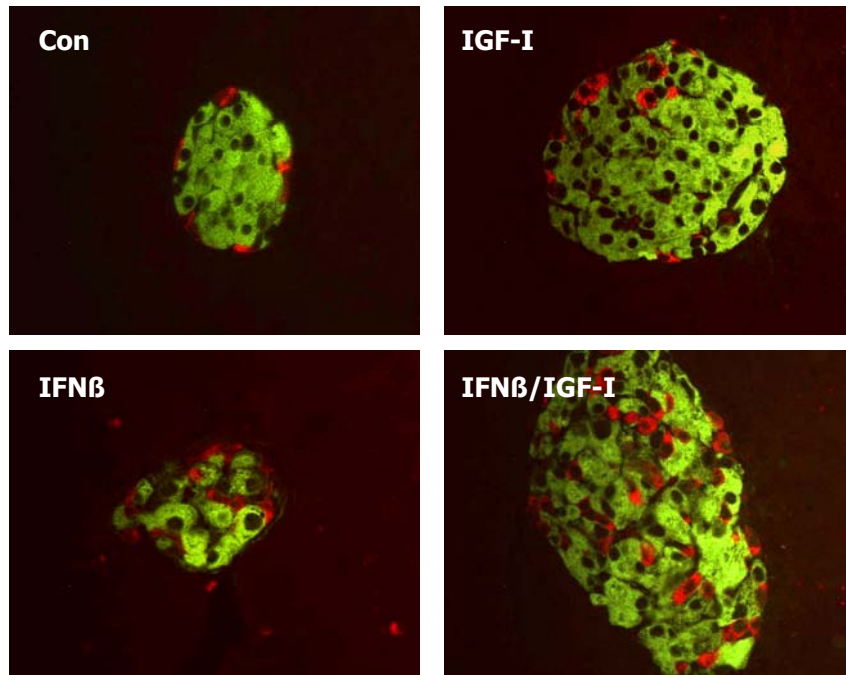


Figura 28. Anàlisi histològica del pàncrees dels animals dobles transgènics IFN β /IGF-I, després del tractament amb 20 mg de STZ. Es van fer talls histològics de pàncrees d'animals després de 4 mesos de tractament amb 20 mg de STZ controls, transgènics IGF-I, transgènics IFN β i dobles transgènics IFN β /IGF-I. Es van incubar amb anticossos anti-insulina (verd) i anti-glucagó (vermell), com s'indica en Materials i Mètodes. Amplificació x400.

Aquest estudi suggeria que la síntesi i l'acció local d'IGF-I en les cèl·lules β , conjuntament amb l'expressió d'IFN β , protegia als animals dobles transgènics IFN β /IGF-I de desenvolupar diabetis després del tractament amb STZ. Això estava d'acord amb estudis anteriors, en que es demostrava que IGF-I era capaç de regenerar el pàncrees d'animals diabètics induïts per tractament amb STZ (George, 2002).