

V. DISCUSSIÓ

La diabetis tipus 1 és deguda a la deficiència d'insulina com a resultat de la destrucció selectiva de les cèl·lules β pancreàtiques. Quan se'n presenten els símptomes ja s'han destruït aproximadament el 60-80% de les cèl·lules productores d'insulina. En la patogènesi de la diabetis tipus 1 hi ha involucrats factors ambientals que activarien mecanismes autoimmunitaris d'individus genèticament susceptibles, provocant la progressiva pèrdua de les cèl·lules β pancreàtiques (Zimmet, 2001). Hi ha evidències clares que relacionen el sistema immunitari amb el desenvolupament de la diabetis tipus 1, en aquest procés hi participen: autoantígens presentats per la cèl·lula β , macròfags/cèl·lules dendrítiques, limfòcits B i limfòcits T, així com citoquines i anticossos (Yoon, 2001).

En el nostre laboratori s'havien generat ratolins transgènics que sobreexpressaven IFN β humà exclusivament en les cèl·lules β pancreàtiques sota el control del promotor del gen de la insulina de rata. Aquests animals presentaven alteració de la funcionalitat de la cèl·lula β , intolerància a la glucosa i una lleugera hiperglicèmia i hipoinsulinèmia (Pelegri, 1998). A més, presentaven sobreexpressió de molècules de MHC de classe I en les cèl·lules β . Quan s'encreuaven amb ratolins CD1, s'obtenia una colònia més susceptible a desenvolupar diabetis. També es va observar que els ratolins transgènics mostraven una major sensibilitat al tractament amb estreptozotocina (Pelegri, 1998). En aquest treball ens vam plantejar aprofundir en l'estudi fenotípic d'aquests animals. En l'estudi previ els ratolins només eren un 87.5% congènics amb el fons genètic CD1. Es van realitzar retroencreuaments fins a 10 generacions (N10) i es van obtenir ratolins transgènics i controls pràcticament un 100% en fons genètic CD1. Quan s'analitzaven histològicament els pàncrees d'aquests animals s'observava que únicament els ratolins transgènics expressaven IFN β en les cèl·lules β , i aquest colocalitzava amb l'expressió d'insulina.

Els animals transgènics normoglicèmics i normoinsulinèmics amb els que s'ha realitzat aquest estudi, mostraven infiltració limfocitària dels seus illots en diferent grau. La causa d'aquesta infiltració estaria relacionada amb l'expressió d'IFN β en les cèl·lules β , donat que els illots dels ratolins controls no presentaven infiltració. En aquests animals l'expressió d'IFN β pot induir l'expressió de molècules MHC-I (Pelegri, 1998). Hi ha estudis que demostren que les cèl·lules β poden expressar antígens MHC-I presentant antígens procedents de l'ambient com infeccions virals, tòxics etc. Aquests antígens poden ser

reconeguts per cèl·lules T CD8 citotòxiques i induir directament la seva destrucció, a la vegada que poden estimular tota una resposta immunitària secundària contra les cèl·lules β de l'illot (Notkins, 2001). A més, s'ha demostrat que els defectes en el processament d'antígens pot resultar en una inapropiada preparació de les molècules de MHC de classe I i per tant, una inadequada selecció negativa de les cèl·lules T CD8⁺ en individus propensos a desenvolupar diabetis (Rosmalen, 2002). Estudis morfològics en pàncrees humans procedents de pacients diabètics tipus 1 mostren una marcada i constant inflamació autoimmune, probablement dirigida per macròfags i limfòcits al voltant i infiltrant l'interior de l'illot (Notkins, 2001). A més, existeixen estudis realitzats amb animals transgènics que expressen molècules de MHC en les cèl·lules β en els quals es demostra un efecte perjudicial d'aquesta expressió que condueix a la instauració de diabetis (Allison, 1988; Sarvetnick, 1988; Lo, 1988).

Tot i que els animals RIP/hIFN β no desenvolupen diabetis oberta, es podria considerar que els animals es troben en un estat pre-diabètic, donat que presenten alteracions funcionals pancreàtiques, un increment en l'expressió de molècules MHC I (Pelegri, 1998) i els resultats d'aquest estudi mostren que es produeix un grau important d'infiltració limfocitària en els illots. A més, hem pogut observar la presència de limfòcits T CD4 i CD8. Molts estudis demostren que el procés diabètic és un procés crònic que pot durar mesos o anys. Durant aquest període l'illot pot presentar una infiltració variable que farà a les cèl·lules β més sensibles a patir lesions o danys. És en aquest moment on factors ambientals poden desencadenar o regular la pèrdua progressiva de la massa de cèl·lula β , pèrdua de la tolerància a la glucosa i finalment aparició d'hiperglicèmia i hipoinsulinèmia, i per tant, diabetis oberta (Atkinson, 2001).

Els factors ambientals que poden desencadenar o modular la resposta immunitària contra els illots pancreàtics poden ésser: virus, nutrients, tòxics, antibiòtics, etc. S'ha descrit àmpliament que el tractament amb múltiples dosis baixes d'estreptozotocina induïx diabetis autoimmune mitjançada per cèl·lules T (Like, 1976; Rossini, 1977). Hi ha estudis que mostren que són les cèl·lules Th1 les cèl·lules que hi juguen un paper principal. La STZ estimularia a aquestes cèl·lules a produir citoquines tals com IFN γ , IL-2, TNF α , que

activarien macròfags i cèl·lules T citotòxiques, i induirien la destrucció de les cèl·lules β (Lukic, 1998).

El fet d'expressar IFN β en les cèl·lules β feia més sensibles als animals transgènics a desenvolupar diabetis autoimmune després del tractament amb baixes dosis de STZ. Els ratolins transgènics presentaven una marcada hiperglicèmia pocs dies després del tractament amb 25 o 30 mg/kg de STZ. Així mateix, els ratolins controls també presentaven una lleugera hiperglicèmia que assolía valors màxims de 350 mg/dl després de 2 mesos del tractament. Això demostrava que aquestes dosis de STZ encara eren massa elevades per evitar el seu efecte tòxic directe sobre les cèl·lules β . Amb la finalitat d'estudiar l'efecte de la STZ exclusivament sobre animals sensibilitzats, que expressaven IFN β , es van administrar dosis més baixes de STZ (15 o 20 mg/kg) a ratolins controls i transgènics. Al contrari dels ratolins controls, els ratolins transgènics presentaven una marcada pèrdua de cèl·lules productores d'insulina, la qual cosa anava acompanyada d'una important infiltració limfocitària dels illots on s'hi podien detectar cèl·lules T tant CD8 $^{+}$ com CD4 $^{+}$. El grau d'insulinitis mostrava un significant increment que coincidía amb l'aparició de diabetis oberta i amb la dosi de STZ administrada. La citotoxicitat sobre la cèl·lula β associada al tractament amb STZ (tant amb 15 com 20 mg/Kg) no era suficient per causar diabetis en els ratolins controls. De manera que en administrar aquestes dosis tan baixes s'evitaven els efectes citotòxics que provoquen la mort de les cèl·lules β quan s'administren dosis de STZ de 40 mg/kg.

Tant en humans com en ratolins, hi ha dues classes principals de limfòcits T: cèl·lules T CD8 $^{+}$ citotòxiques, les quals reconeixen antígens processats (per exemple pèptids) i units a molècules de MHC-I de la superfície de les cèl·lules (per exemple les cèl·lules β), i cèl·lules T CD4 $^{+}$ col·laboradores (de l'anglès "helper"), les quals reconeixen antígens processats i units a molècules de MHC-II de la superfície de cèl·lules presentadores d'antígens (APCs) com macròfags i cèl·lules dendrítiques. En la diabetis tipus 1 la interacció directa (cèl·lula-cèl·lula) entre cèl·lules CD8 $^{+}$ i antígens presentats per la cèl·lula β resulta amb la destrucció selectiva d'aquestes cèl·lules pancreàtiques. Per contra, les cèl·lules T CD4 $^{+}$ no poden reconèixer antígens presentats per la cèl·lula β donat que aquestes no expressen molècules de MHC de classe II (Kim, 2002). En aquest cas, seria un mecanisme indirecte el que

provoca la mort de la cèl·lula β . Ambdós mecanismes es creu que provoquen l'activació de caspases induint l'apoptosi d'aquestes cèl·lules, però sense descartar que la necrosi també hi té un paper (Gallaher, 2000). Tots aquests mecanismes poden estar involucrats en la patogènesi que presenten els ratolins transgènics RIP/hIFN β . El fet d'expressar IFN β induiria la hiperexpressió de molècules MHC de classe I sobre la superfície de les cèl·lules β , provocant la reacció de les cèl·lules T CD8 $^{+}$ com a resposta directa i el reclutament de cèl·lules T CD4 $^{+}$ com a resposta indirecta.

En la bibliografia existeixen altres models animals que també presenten infiltració en els illots però que aquesta no és suficient per induir diabetis. Ratolins transgènics que expressen també una citoquina en les cèl·lules β , com la IL-12 (RIP-IL12), presenten infiltració amb cèl·lules CD4 $^{+}$, cèl·lules CD8 $^{+}$ i macròfags, però tampoc desenvolupen diabetis oberta (Holz, 2001). Quan aquests ratolins transgènics s'encreuen amb ratolins transgènics RIP-LCMV, que expressen una proteïna del virus de la coriomeningitis limfocítica, els ratolins dobles transgènics acaben desenvolupant la malaltia (Holz, 2001).

S'ha descrit que la STZ indueix l'expressió de citoquines en els illots i que un increment d'IFN α potencia els efectes diabetogènics del tòxic (Huang, 1994). Tanmateix, s'ha demostrat també que el tractament amb múltiples dosis de 40 mg de STZ conjuntament amb poly I/C (RNA de dobles cadena inductor dels IFNs tipus I) incrementa la infiltració limfocitària dels illots així com la seva lesió. De la mateixa manera, s'ha observat que el tractament amb poly I/C condueix a diabetis a les rates BB DR (resistents a diabetis) i accelera el desenvolupament de la diabetis en les rates BB DP (predisposades a la diabetis). A més, animals transgènics que expressen IFN α en el pàncrees a uns nivells suficients per a causar una moderada insulitis, però insuficients per a induir diabetis, quan se'ls tracta amb MLDSTZ aquest procés s'accelera (Huang, 1994). Estudis més recents demostren que el tractament amb STZ en ratolins NOD incrementa el percentatge de diabetis en aquests individus (Horwitz, 2002). No obstant, aquests animals no tenen una resposta tan exacerbada com la dels ratolins transgènics BDC2.5T els quals expressen un transgen que codifica per un receptor de la cèl·lula T (TCR) diabetogènic que és específic per un antigen de l'illot, això els fa més susceptibles, tant al tractament amb STZ com amb poly I/C (Horwitz, 2002). Aquests ratolins després del tractament amb una sola dosi de STZ (160

mg/kg) presenten un fenotip similar al dels ratolins RIP/IFN β tractats amb 20 mg/Kg de STZ. Ara bé, els ratolins Rip/hIFN β mostren una sensibilitat molt més alta a la STZ, donat que amb menys dosi desenvolupen un procés diabètic crònic i per tant, podrien ser molt útils per l'estudi de la patologia diabètica.

En aquest estudi també hem observat que els ratolins transgènics Rip/hIFN β expressen Fas, de manera que una de les causes principals de la destrucció de les cèl·lules β , en aquests animals, podria ser per un mecanisme apoptòtic. A més, aquests animals presenten expressió de BAD, una proteïna pro-apoptòtica, en els illots pancreàtics. També, es poden detectar nuclis apoptòtics en les cèl·lules β . Així, podem concloure que la destrucció de les cèl·lules β , en aquests animals és molt probablement per un mecanisme d'apoptosi. Aquests resultats estarien d'acord amb què l'apoptosi és el mecanisme pel qual el sistema immunitari indueix la mort a les cèl·lules β en la diabetis tipus 1. Els responsables semblen ser els macròfags i limfòcits T citotòxics, que via Fas/FasL, perforina, granzim, TNF, IFN γ o IL-1 β provoquen l'activació de les vies apoptòtiques (Chandra, 2001). En ratolins NOD s'ha demostrat que la via Fas/FasL juga un paper primordial en la destrucció selectiva de les cèl·lules β (Chervonsky, 1997). Estudis amb cultius de cèl·lula β també mostren que IL-1 β indueix l'expressió de Fas i Fas lligant (Loweth, 1998; Stassi, 1995), així com, el TNF α conjuntament amb IFN γ són efectivament els iniciadors de la mort de les cèl·lules β (Laffranchi, 1997; Stephens, 1999). A més, en biòpsies de pàncrees procedents de pacients recent diagnosticats de diabetis tipus 1 s'ha trobat expressió tant de Fas com de Fas lligant (FasL), que estarien involucrats en l'apoptosi de la cèl·lula β (Moriwaki, 1999). Estudis amb cèl·lules β procedents de ratolins transgènics NOD que expressen FasL demostren que són més susceptibles a l'apoptosi induïda per citoquines (Petrovsky, 2002). Molt probablement, el mecanisme pel qual les citoquines estimulen l'expressió de Fas en les cèl·lules β pancreàtiques en part és la via NF- κ B (Darville, 2001). També, estudis recents han demostrat que no només en la diabetis tipus 1 el mecanisme apoptòtic induït per citoquines via Fas-FasL pot jugar un paper important (Maedler, 2002). Sembla ser, que també un procés inflamatori té lloc en la patogènesi de la glucotoxicitat en la diabetis tipus 2 i s'ha identificat la via IL-1 β /NF- κ B/Fas com a responsable d'aquest procés.

Els resultats del nostre estudi ens suggereixen que els ratolins transgènics RIP/hIFN β són un bon model per estudiar la diabetis autoimmune. Altres models animals de diabetis tipus 1, com els ratolins NOD presenten limitacions, són una soca consanguínia que ha provocat la fixació d'immunodeficiències que els fa molt sensibles i els limita a mantenir-los en instal·lacions lliures de patògens. El percentatge d'individus que desenvolupen diabetis espontània depèn molt de l'ambient on es troben i el percentatge varia segons el sexe. Així, s'ha observat que les femelles són més sensibles que els mascles, però la majoria d'estudis metabòlics i fisiològics realitzats en la literatura s'ha dut a terme en mascles. A més, és necessària l'administració d'insulina per tal de mantenir les colònies. Per això, els ratolins RIP/hIFN β poden ser una bona alternativa, ja que el 100% dels mascles desenvolupen diabetis després del tractament amb dosis molt baixes de STZ (15 o 20 mg/kg), són de fàcil maneig i manteniment.

Malgrat l'avanç important en la prevenció i tractament de la diabetis tipus 2 (Knowler, 2002), el tractament amb insulina de la diabetis tipus 1 roman essencialment sent el mateix des de fa 80 anys. Actualment, molts dels esforços de la comunitat científica es centren en trobar tant noves teràpies com mecanismes de prevenció. Per a l'assaig d'aquestes teràpies serà necessari tenir bons models animals. Així, l'obtenció de models animals que presentin fenotips similars als pacients humans, permetran avançar en la generació i millora, tant de noves teràpies com de teràpies ja existents. Els ratolins transgènics RIP/hIFN β podrien ser un bon candidat a contribuir en aquest sentit.

Donat que els animals transgènics RIP/hIFN β després del tractament amb STZ presentaven una marcada pèrdua de massa de cèl·lules β per un procés d'apoptosi, que conduïa a desenvolupar diabetis, vàrem estudiar si l'expressió simultània d'un factor de creixement en les cèl·lules β podria revertir aquest efecte. De fet, s'ha descrit que IGF-I és un agent antiapoptòtic efectiu (Harrington, 1994). En el nostre laboratori s'havien obtingut els ratolins transgènics RIP/IGF-I que expressaven IGF-I específicament en les cèl·lules β pancreàtiques mitjançant el promotor de la insulina-I de rata (RIP-I). Aquests animals eren normoglicèmics i normoinsulinèmics, i no presentaven alteracions en la massa de cèl·lula β (George, 2002). Tanmateix, després de la inducció de diabetis experimental en animals adults mitjançant el tractament amb 5 dosis de 50 mg/kg STZ, s'havia observat una

normalització gradual de tots els paràmetres metabòlics. També, s'havia observat una recuperació en la massa de cèl·lula β resultat d'un augment en la taxa de replicació i neogènesi d'aquestes cèl·lules (George, 2002). Per tal d'estudiar si IGF-I era capaç de contrarestar la diabetis autoimmunitària induïda conjuntament per l'expressió local d'IFN β i el tractament amb molt baixes dosis de STZ, vàrem generar animals dobles transgènics IFN β /IGF-I.

Els animals IFN β /IGF-I eren normoglucèmics i normoinsulinèmics, no presentaven cap alteració morfològica del pàncrees i mostraven colocalització de la insulina, interferó β humà i IGF-I. Aquests animals, al contrari que els seus germans Tg IFN β no presentaven pràcticament infiltració. Així, el fet d'expressar IGF-I protegia als animals dobles transgènics IFN β /IGF-I de l'atac immunitari induït per l'expressió d'IFN β . Amb l'objectiu de determinar si IGF-I era capaç de protegir o restaurar l'efecte del tractament amb dosis baixes de STZ, es van tractar ratolins controls, Tg IFN β , Tg IGF-I i dobles transgènics Tg IFN β /IGF-I amb 30 mg/Kg de STZ durant 5 dies consecutius. Pocs dies després del tractament s'observava aparició de diabetis oberta en els ratolins Tg IFN β , amb un increment molt elevat de la seva glucèmia. Els ratolins dobles Tg IFN β /IGF-I presentaven diferents sensibilitats al tractament, i s'hi podien distingir 3 poblacions diferents. Un 37,5% dels animals mostraven un increment molt elevat de la seva glucèmia similar al dels ratolins Tg IFN β . Mentre que, un 37,5% dels ratolins dobles transgènics presentaven un menor augment de la seva glucèmia, i era semblant al que presentaven els ratolins controls. Finalment, en un 25% dels ratolins dobles Tg s'observava una total restauració de la glucèmia, mostrant valors normalitzats i similars als dels seus germans Tg IGF-I. Això estava d'acord amb els resultats observats anteriorment, en els que ratolins Tg IGF-I mostraven una recuperació de la hiperglicèmia després del tractament amb STZ (George, 2002). Quan s'analitzaven altres paràmetres com: la viabilitat, el comportament a la sobrecàrrega de glucosa, la insulinèmia i glucèmia, s'observava una restauració de tots aquests paràmetres. Això suggeria que IGF-I era capaç de contrarestar l'efecte de la STZ, probablement disminuint l'efecte directe del tòxic sobre la cèl·lula β , donat que els ratolins controls també presentaven un lleuger augment de la glucèmia superior al que presentaven els ratolins Tg IGF-I. Probablement el fet d'expressar IGF-I en la cèl·lula β protegia a aquesta del dany directe provocat per una dosi elevada de STZ. S'ha descrit que IGF-I o altres factors actuant via receptor IGF-I, poden induir

supervivència en les cèl·lules enfront el dany provocat per estrès, hipòxia o canvis en el pH (Peretz, 2002). Altres estudis demostren també l'efecte antiapoptòtic d'IGF-I induït per agents citotòxics (Hurbin A, 2002).

Per tal de determinar si l'IGF-I era capaç de protegir l'efecte immunoestimulador del tractament amb dosis molt més baixes de STZ, es van tractar ratolins controls, Tg IFN β , Tg IGF-I i dobles transgènics Tg IFN β /IGF-I amb 20 mg/Kg de STZ durant 5 dies consecutius. Després del tractament amb STZ els ratolins controls i Tg IGF-I no mostraven cap canvi ni en la glucèmia, ni en la insulinèmia. Això ens suggeria que aquesta dosi de STZ era suficientment baixa per no provocar efectes tòxics directes sobre la cèl·lula β . Pel contrari, els ratolins Tg IFN β presentaven un increment progressiu de la glucèmia, acompanyat d'una important infiltració. Finalment, aquests animals acabaven perdent més del 80% de la massa de cèl·lula β que conduïa a l'aparició de diabetis oberta. Però, el fet que els ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I expressessin IGF-I els protegia de desenvolupar hiperglicèmia, hipoinsulinèmia i la resta de paràmetres presentaven valors similars als dels seus germans controls sans. Tot això, semblava indicar que l'IGF-I, apart de tenir un possible paper protector contra l'efecte tòxic directe de la STZ, també protegia contra la resposta immunitària induïda per l'acció de la STZ i iniciada per l'expressió d'IFN β . La injecció de múltiples dosis de STZ provoca la mort de les cèl·lules β per apoptosi (O'Brien, 1996), a més, el tractament amb STZ indueix la formació de radicals lliures i òxid nítric (NO) en l'illot (Turk, 1993), directament involucrats en la destrucció de la cèl·lula β . Molt probablement la producció local d'IGF-I protegeix a les cèl·lules dels efectes oxidatius i apoptòtics induïts tant pel tractament amb STZ com pel fet d'expressar IFN β . Aquests resultats estarien d'acord amb els estudis *in vitro* que demostren l'efecte protector d'IGF-I contra la mort cel·lular mitjançada per citoquines (Mabley, 1997). A més, l'IGF-I és capaç de bloquejar l'activitat òxid nítric sintasa (iNOS) *in vitro* (Castrillo, 2000). Estudis *in vivo* mostren que ratolins deficientes per iNOS estan protegits contra la destrucció de cèl·lules β induïda pel tractament de múltiples dosis de STZ (Flodström, 1999).

S'ha descrit que IGF-I pot estimular l'expressió de proteïnes anti-apoptòtiques de la família de les proteïnes Bcl. Així, IGF-I pot sobrerregular l'expressió de Bcl-X $_L$ (Párrizas, 1997) i inhibir la "down-regulation" de la proteïna Bcl-2 (Tamatani, 1998). A més, IGF-I via el seu

receptor pot fosforilar i inactivar a BAD (Datta, 1997). Paral·lelament, l'administració tant d'IGF-I com d'IGF-II protegeixen la viabilitat de la cèl·lula β en ratolins NOD, ambdós per reducció de la infiltració de cèl·lules T citotòxiques i per protecció de la inducció d'apoptosi induïda per Fas-Fas lligant (FasL) (Kaino, 1998).

Els mecanismes pels quals IGF-I pot inhibir l'apoptosi involucren tant la via de les proteïnes MAP quinases (MAPK) com la via de la fosfatidilinositol-3- fosfat quinasa (PI3K). Aquests enzims s'indueixen després de la fosforilació del receptor d'IGF-I (IGF-IR) i la fosforilació del substrat del receptor de la insulina 1 (IRS1) (Gallaher, 2001). Diversos autors descriuen aquestes vies de senyalització com les principals mitjançadores de l'acció anti-apoptòtica de l'IGF-I. Estudis en què s'utilitzen inhibidors en diferents punts d'aquestes vies han demostrat que es bloqueja l'efecte anti-apoptòtic de l'IGF-I (Le Roith, 1997). Estudis *in vitro*, també demostren que l'acció anti-apoptòtica d'IGF-I o altres lligants del seu receptor (IGF-IR) poden implicar diferents vies de senyalització: IRS-1/PI3K-Akt/PKB, IRS-1/Raf/MEK/MAPK o fosforilació directa en residus de serina del receptor/proteïnes 14.3.3/Raf etc. Totes aquestes vies poden provocar la fosforilació de la proteïna pro-apoptòtica BAD, inactivant-la i així inhibir l'apoptosi (Peruzzi, 1999).

L'IGF-I no té únicament un paper protector contra la mort cel·lular, si no que també té un paper important tant en la proliferació com en la replicació de les cèl·lules β . Estudis *in vitro* amb cèl·lules Ins-1 demostren la capacitat d'IGF-I per induir proliferació i replicació d'aquestes cèl·lules, a més, aquest procés és dependent de glucosa (Hügl, 1998). Estudis *in vivo* indiquen que l'expressió local d'IGF-I en les cèl·lules β resulta en un increment de la neogènesi i replicació d'aquestes cèl·lules després del tractament amb STZ (George, 2002). D'acord amb això, hi ha observacions *in vivo* que indiquen que la senyalització a través del receptor d'IGF-I promou el desenvolupament i la proliferació de la cèl·lula β (Withers, 1999). Tot i que la manca del receptor d'IGF-I exclusivament en les cèl·lules β no afecta a la massa d'aquestes cèl·lules, resulta en una alteració de la tolerància a la glucosa, associada amb una disminució de la secreció d'insulina dependent de glucosa i arginina. (Xuan, 2002). A més, la manca de IGF-IR en les cèl·lules β provoca una reducció en l'expressió de Glut-2 i glucoquinasa GK i, com a resultat, una alteració en la secreció d'insulina dependent de glucosa, però sense afectar a la massa de cèl·lula β . Així, IGF-IR no seria crucial pel

desenvolupament de la cèl·lula β però sí que participaria en el control de la diferenciació (Kulkarni, 2002). Per altra banda la manca conjunta d'IGF-IR i el substrat del receptor de la insulina 2 (IRS-2), provoca una marcada disminució de la massa de cèl·lules β i els animals moren de diabetis (Withers, 1999).

Els ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I mostraven una massa de cèl·lula β similar a la dels seus germans controls i Tg IGF-I. Però s'observava una desorganització en la distribució cel·lular de l'illot, tant els tractats amb 30 com 20 mg/kg de STZ, detectant-se cèl·lules α en el seu interior. La desorganització cel·lular en illots està associada a variacions en el la mida. Ratolins deficients en el receptor d'insulina (IR) i el seu substrat (IRS1) presenten desorganització cel·lular, distribuïnt-se les cèl·lules α a l'interior de l'illot (Brüning, 1997). Així mateix, ratolins transgènics que expressen IGF-II exclusivament en les cèl·lules β són hiperplàsics i presenten també una marcada desorganització cel·lular de l'illot (Devedjian, 2000). També s'ha observat desorganització de l'illot associada a la reducció de la mida d'aquests, ratolins deficients per IRS-2(-/-) (Whiters, 1998), IRS-1 (-/-) i IRS-2 (+/-), IRS-1 (+/-) i IRS-2 (-/-), IGF-IR (+/-) i IGF-IR (-/-) (Whiters, 1999) mostren una marcada alteració de la distribució cel·lular.

Tots aquests resultats ens suggereixen que l'IGF-I podria tenir un paper de factor de supervivència com a agent protector contra els efectes tòxics, immunològics i apoptòtics de l'expressió d'IFN β , reforçada per l'acció de la STZ, i un paper de factor de creixement com a agent estimulador, tant de la proliferació i neogènesi, com de la diferenciació cel·lular. Per tant, la transferència del gen IGF-I a pàncrees endocrí podria representar una aproximació de teràpia gènica per a la diabetis tipus 1, i els animals RIP/hIFN β podrien ser un bon model per provar aquest tipus de teràpia. Actualment en el nostre laboratori s'estan estudiant i desenvolupant protocols de transferència d'IGF-I *in vivo* a animals diabètics.

VI. CONCLUSIONS

- 1)** El fet d'expressar IFN β en les cèl·lules β pancreàtiques indueix al sistema immunitari a atacar als illots dels animals transgènics RIP/hIFN β i els fa més susceptibles a desenvolupar diabetis tipus 1.
- 2)** Els ratolins transgènics RIP/hIFN β pocs dies després del tractament amb dosis baixes de STZ (25 o 30 mg/kg) mostren diabetis oberta, mentre que els seus germans control presenten una lleugera hiperglicèmia.
- 3)** Després del tractament amb dosis molt baixes de STZ (15 o 20 mg/kg) els ratolins transgènics presenten un augment progressiu de la seva glucèmia paral·lel al augment crònic del grau d'insulinitis. A més, els ratolins transgènics desenvolupen una severa hipoinsulinèmia, disminució del contingut d'insulina pancreàtic i una dràstica pèrdua de la massa de cèl·lules β , probablement per un mecanisme d'apoptosi. Per contra, els ratolins control no mostren cap d'aquests efectes.
- 4)** Tots aquests resultats ens suggereixen que els ratolins RIP/hIFN β poden ser un bon model experimental tant per a l'estudi de l'etiopatogènesi com per l'estudi de noves teràpies de la diabetis tipus 1.
- 5)** S'han obtingut ratolins dobles transgènics que expressen hIFN β i IGF-I en les cèl·lules β del pàncrees mitjançant l'encreuament d'animals RIP/hIFN β amb ratolins RIP/IGF-I (IFN β /IGF-I).
- 6)** Després del tractament amb STZ (30 mg/kg) els ratolins dobles transgènics presenten una millora en la glucèmia, insulinèmia i la sobrecàrrega de glucosa, respecte els seus germans Tg IFN β .
- 7)** El fet de co-expressar IGF-I en els ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-I, protegeix totalment del desenvolupament de diabetis després del tractament amb dosis molt baixes de STZ (20 mg/kg).
- 8)** Tots aquests resultats indiquen que la producció local d'IGF-I en les cèl·lules β pot protegir contra el desenvolupament de diabetis tipus 1.

VII. MATERIALS I MÈTODES

1. MATERIALS.

1.1. ANIMALS.

Els animals utilitzats en aquest estudi procedeixen de colònies prèviament establertes i caracteritzades en el nostre laboratori. Els ratolins que sobreexpressen el gen del IFN- β en cèl·lules β pancreàtiques s'havien generat a partir del creuament de les soques C57BL/6 i SJL (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) (Pelegrin, 1998). Posteriorment aquests animals foren retrocreuats amb CD1 fins arribar a la generació N10. Els ratolins que expressen el gen quimèric RIP/IGF-I en les cèl·lules β pancreàtiques s'havien generat també a partir d'híbrids C57BL6/SJL (George, 2002). Aquests posteriorment es van retrocreuar amb CD1 fins arribar a la generació N5.

Tots els animals, tant controls com transgènics, es trobaven en condicions de temperatura i llum controlada (12 hores de llum i 12 de foscor) i eren alimentats de forma rutinària amb una dieta estàndard de laboratori (Panlab MR, Barcelona). Els animals es van utilitzar d'acord amb la legislació vigent i amb l'aprobació del Comitè d'Ètica i d'Experimentación Animal i Humana de la UAB.

1.2. REACTIUS.

Els reactius de biologia molecular s'obtingueren de les cases comercials Roche (F.Hoffmann - La Roche Ltd., Basel, Suïssa), Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EEUU), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EEUU), Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EEUU), Sigma (St.Louis, MO, EEUU) i Proligo Biochemie GmbH (Hamburg, Alemanya). Els productes marcats radioactivament [α - 32 P]dCTP s'adquiriren a Amersham Biosciences. La estreptozotocina (ref S-0130) utilitzada per induir diabetis experimental es va adquirir de Sigma.

1.3 SONDES.

Les diferents sondes utilitzades pels Southern blot van ser les següents: en el cas d'IFN β corresponia a un fragment de 615 pb del cDNA d'IFN- β humà amplificat per PCR i, en el cas d'IGF-I a un fragment EcoRI/EcoRI de 0.72Kb del cDNA d'IGF-I de ratolí.

1.4. OLIGONUCLEÒTIDS.

Els oligonucleòtids utilitzats per a la realització de la PCR d'IFN- β es van demanar a Proligo Biochemie GmbH. Les seqüències dels primers utilitzats són les següents:

hIFN β 17U : 5' - GGC ACA ACA GGT AGT AGG - 3' (18 mer)

hIFN β 632L: 5' - AGT CCC AGA GGC ACA GG - 3' (17 mer)

1.5 ANTICOSSOS.

Els anticossos utilitzats van ser els següents:

- anticòs de ovella contra IFN- β humà – Biosource International, Camarillo, USA.
- anticòs de conill porquí contra insulina porcina - Sigma Chemical Co., St Louis, MO.
- anticòs de conill contra IGF-I humà - GroPep Pty. Ltd., North Adelaide, Australia.
- anticòs de conill contra glucagó - ICN Biochemicals Inc., Cleveland, OH.
- anticòs de conill contra somatostatina – LABGEN.
- anticòs de conill contra polipèptid pancreàtic humà - ICN Biochemicals Inc., Cleveland.
- anticòs de conill contra Bad – Santa Cruz Biotechnology, ING.
- anticòs de rata contra CD4 de ratolí, biotinilat - PharMigen International.
- anticòs de rata contra CD8 de ratolí, biotinilat - PharMigen International.
- anticòs de cabra contra Fas de ratolí – R&D SYSTEMS.
- anticòs secundari de cabra contra IgG de conill, biotinilat – PIERCE, Illinois, USA.
- anticòs secundari de cabra contra IgG de conill, conjugat a TRITC - Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, Alabama.
- anticòs secundari de conill contra IgG de conill porquí, conjugat amb peroxidasa – DAKO corp., Carpinteria, CA.
- anticòs secundari de conill contra IgG de conill porquí, conjugat a FITC - Sigma Chemical Co.
- anticòs secundari de conill contra IgG d'ovella, conjugat amb FITC – DAKO corp., Carpinteria, CA.
- anticòs secundari de conill contra IgG de conill porquí, conjugat amb rodamina - Sigma Chemical Co.
- anticòs secundari d'ase contra IgG de cabra, conjugat amb Biotina – Santa Cruz Biotechnology, ING.
- anticòs terciari conjugat amb el complex ABC – PIERCE, Illinois, EEUU.

- anticòs terciari streptavidina conjugat amb AMCA – VECTOR, Burlingame, CA, EEUU.
- anticòs terciari streptavidina conjugat amb TEXAS RED – Invitrogen corp., Carlsbad, CA, EEUU.
- anticòs terciari streptavidina conjugat amb FITC – Invitrogen corp., Carlsbad, CA, EEUU.
- TUNEL – Kit Roche (F.Hoffmann - La Roche Ltd., Basel, Suïssa).

Com a cromògens s'utilitzaren el 3'3'-diaminobenzidine i el 3-amino-9-ethylcarbazole de Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, MO.

2. MÈTODES.

2.1. OBTENCIÓ I ANÀLISI DEL DNA.

2.1.1. Obtenció de DNA genòmic.

La detecció dels animals transgènics es fa mitjançant Southern blot o PCR. En ambdós casos es parteix de DNA obtingut de la digestió de fragments de cua dels ratolins. El mètode que es segueix consisteix en digerir els fragments de cua en una solució tamponada que conté proteinasa K i SDS, incubació a 56°C durant la nit. Aquesta digestió permetrà l'alliberació del DNA al medi, posteriorment es purificarà el DNA mitjançant una precipitació per salinitat i isopropanol, resuspenent-se finalment en TE.

Solucions utilitzades en el protocol:

Solució de l·lisis (preparació extemporànea)

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

TE

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

2.1.2. Anàlisi del DNA per Southern blot.

Es va utilitzar la tècnica de Southern blot per determinar la presència del gen quimèric en ratolins transgènics. Els DNAs que s'obtenen a partir de l'extracció es digereixen amb l'enzim de restricció adequat segons el transgen que s'estigui analitzant (Bgl II per IFN- β i EcoRI per IGF-I). Es realitza una digestió durant la nit utilitzant uns 10 μ g de DNA per digestió. El dia següent es realitza una electroforesis en gels del 1% d'agarosa/TAE 1x, es deixen córrer les digestions durant unes 4-5 hores entre 50-60 V. Posteriorment es realitza el tractament del gel per tal d'assegurar una bona transferència del DNA a la membrana de nylon, aquest tractament consisteix en: 15 minuts en una solució HCl 0.25N, per aconseguir la despurinització i assegurar la transferència en el filtre de les bandes d'elevat pes molecular; 20 minuts en una solució alcalina (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) per tal de desnaturalitzar el DNA i facilitar-ne també la transferència; i un mínim de 20 minuts en una solució neutralitzant (1 M Tris, 3 M NaCl) que permetrà neutralitzar el pH i carregar negativament el DNA de nou.

La transferència es realitza a membranes de nylon carregades positivament (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN - ref.1 417 240) mitjançant capil·laritat per pressió negativa en tampó d'alta força iònica (10x SSC), mitjançant papers (GB002 i GB004 - Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire). La transferència es realitza en un mínim de 2 hores, però es pot deixar també durant la nit. Un cop finalitzada, el filtre és irradiat amb llum ultravioleta d'ona curta per crear unions covalents del DNA amb el nylon mitjançant l'ús d'un UV-Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, CA).

Un cop el DNA està fixat a la membrana es procedeix a la realització de la prehibridació, durant unes 2 hores a 65°C. La solució de prehibridació conté principalment proteïnes, detergents com el SDS i ssDNA per tal que s'hibridin i bloquegin la membrana, reduint així la hibridació inespecífica. Posteriorment es realitza la hibridació amb la sonda marcada radioactivament (3-5.10⁶cpm/ml) durant tota la nit. A continuació es renta per eliminar la sonda en excés i aquella que es mantingui per unions molt dèbils. Es fan 3 rentats consecutius, cada un d'una astringència superior: 2 rentats, de 10 min cada un, amb tampó de baixa astringència, a 30°C i un rentat de 15 min a 65°C amb tampó d'alta astringència.

<u>TAE 1x</u>		<u>20x SSC</u>	
Tris-acetat	40 mM, pH 8,3	NaCl	3 M
EDTA	1 mM	Citrat sòdic	0.3 M, pH 7,4
Bromur d'etidi	0.5 µg/ml		

Solució de prehibridació i hibridació

Na ₂ HPO ₄ - pH 7.2	0,25 mM
SDS	20% (p/vol)
EDTA	1 mM
Blocking reagent (Roche)	0.5% (p/vol)

(ref. 1096176)

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

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

El marcatge de les sondes utilitzades en els Southern blot es realitza a partir del preparat comercial "Ready-To-Go™ DNA Labelling Beads (-dCTP)" (ref. 27-2940-01, Amersham Biosciences) seguint les instruccions del fabricant. Aquesta tècnica permet la síntesis de sondes de DNA d'alta radioactivitat específica ($1,8 \times 10^9$ dpm/mg) i marcades uniformement. La separació dels nucleòtids no incorporats s'aconsegueix mitjançant gel filtració en columnes de Sephadex G-50 (Probe Quant G-50 Micro Columns, Amersham Pharmacia Biotech).

2.1.3. Anàlisi del DNA per PCR.

L'anàlisi del DNA per PCR és un mètode ràpid que permet l'amplificació del transgen si es disposa dels primers adequats. Aquest mètode de detecció és especialment sensible a les contaminacions creuades, de forma que s'ha de treballar amb cura, però d'altra banda presenta l'avantatge que permet treballar més ràpidament, sense necessitat d'utilitzar radioactivitat, amb poc DNA i no excessivament pur d'altres restes cel·lulars. Els primers han d'estar dissenyats de forma que amplifiquin un regió específica i exclusiva del transgen minimitzant la formació d'estructures secundàries i dimers, i que la zona amplificada del transgen es pugui diferenciar de la zona amplificada del gen endògen. La PCR s'utilitza per la detecció dels animals transgènics d'IFN-β.

En la PCR d'IFN- β els primers amplifiquen un fragment de 615 pb del cDNA d'IFN- β humà. D'aquesta manera només obtenim banda en el cas de les mostres de DNA de ratolins transgènics. Els primers utilitzats són els següents:

hIFN β 17U: 5' - GGC ACA ACA GGT AGT AGG - 3' (18 mer)

hIFN β 632L: 5' - AGT CCC AGA GGC ACA GG - 3' (17 mer)

Les condicions són les següents :

Mix 1 - 10 pmols de cada oligo

0,4 μ l dNTPs mix (10mM each)

2 μ l buffer Mg free 10x

1.5 μ l MgCl₂ (1.5 mM final)

x μ l H₂O miliQ

150-200ng DNA

volum total 23 μ l

El cicle és el següent:

Afegir mix 1

Hot start - 5 min 95°C

Afegir mix 2

30 cicles 30" a 95°C

30" a 55°C

45" a 72°C

15 min a 72°C

manteniment a 4°C

Mix 2 - 1,75 μ l H₂O miliQ

0,25 μ l Taq pol. (5 U/ μ l)

volum total 2 μ l

L'amplificació del DNA obtingut a partir d'un fragment de cua es realitza en un termociclador Perkin-Elmer 9600, seguint les instruccions del proveïdor.

2.2. DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES SÈRICS.

Per l'obtenció del sèrum es sacrifiquen els animals per decapitació i immediatament se'ls recull la sang en tubs mantinguts a 0°C. El sèrum s'obté després de deixar coagular la sang durant 30 minuts a 0°C. El coàgul es separa mitjançant centrifugació a 2000xg durant 15 minuts. El sèrum es manté congelat a -20°C fins al moment de la determinació dels diferents paràmetres.

2.2.1. Glucosa.

Els nivells de glucosa sèrica es determinen a partir d'una gota de sang d'animals sagnats per la cua mitjançant el sistema Glucometer Elite™ (Bayer).

2.2.2. Insulina.

La insulina es determina per radioimmunoassaig (RIA) en el sèrum dels animals, mitjançant els kits INSULIN-CT (CIS Biointernational, Gif-Sur-Yvette Cedex, França). El mètode té un límit de sensibilitat de 30 pM i una variació intrassaig del 6%.

2.2.3. IFN-β.

Els nivells d'IFN-β en sèrum es determinen per ELISA a partir dels sèrum obtinguts dels animals. El kit que s'utilitza és el "Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay. Human Interferon-β (HuIFN-β) ELISA Kit" distribuït per TFB, INC. Fabricat per Fujirebio INC., Tokyo, Japó.

2.3. DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT D'INSULINA PANCREÀTIC.

La determinació del contingut pancreàtic d'insulina es fa a partir d'homogenats de pàncrees en 20 volums de solució etanol àcida (75% EtOH: 1,4% HCl). S'extreu el pàncrees de l'animal, es pesa i es submergeix en la solució etanol àcida prèviament refredada a 4°C. Les mostres es mantenen en gel fins que són homogenitzades. A continuació s'incuben a 4°C en agitació suau durant 20-24h. Posteriorment es centrifuguen a 5.000 rpm durant 15 minuts. Finalment, es recull el sobrenadant i es manté a -20°C fins al moment de la determinació de l'hormona. Abans de la determinació de la insulina les mostres s'han de diluir (1/500) amb un tampó fosfat La insulina es determina per radioimmunoassaig, emprant el mateix kit que s'utilitza per la determinació dels nivells sèrics d'insulina. Els resultats s'expressen en relació al pes del pàncrees .

Solució Tampó fosfat: pH 7.5 per 500 mL

Na₂HPO₄.12H₂O 14.5 g

NaH₂PO₄.H₂O 2.7 g

ClNa 9.6 g

BSA 7.5 g

Amb 500 mL H₂O destil·lada, (la composició pot variar lleugerament mentre es mantingui el pH, la molaritat total i la proporció de BSA).

2.4. CORBA DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA.

La corba de tolerància a la glucosa és un test que té com a objectiu comprovar si els animals són capaços de respondre correctament a una sobrecàrrega de glucosa. Aquells animals que mantenen les glucèmies elevades i no recuperen els nivells basals de glucosa durant el temps de realització del test són considerats animals diabètics.

S'escullen animals control i transgènics i, després d'un dejuni d'unes 12 hores, se'ls fa un control de la glucèmia basal a temps zero. La mesura de la glicèmia es fa amb Glucometers Elite™ de Bayer. Quan els animals s'estabilitzen se'ls injecta intraperitonealment una dosi d'1 g/Kg de pes viu de glucosa. A partir d'aquest moment es realitzen extraccions de sang seriades amb un interval de 30 min fins a les 3 hores de l'inici del test.

2.5. INDUCCIÓ DE LA DIABETIS EXPERIMENTAL MITJANÇANT STZ.

L'estreptozotocina (STZ) és una molècula constituïda per N-metil-N-nitrosurea unida al C-2 de la D-glucosa. És un tòxic que actua majoritàriament sobre la cèl·lula β pancreàtica, a la qual destrueix. L'administració de 5 dosis consecutives de STZ produeix una insulinitis pancreàtica que destrueix la cèl·lula β i causa una diabetis oberta.

L'estreptozotocina es dissolt en una solució de citrat sòdic 10 mM amb 0.9 % NaCl, pH 4.5, immediatament abans de la seva administració. S'administren 5 dosis consecutives de STZ via intraperitoneal de 15, 20, 25 o 30 mg/Kg de pes corporal segons cada estudi.

2.6. ANÀLISI IMMUNOHISTQUÍMICA DEL PÀNCREES.

Per la detecció immunohistoquímica d'INF- β , IGF-I, insulina, glucagó, somatostatina, i polipèptid pancreàtic, els pàncrees dels ratolins transgènics i controls es fixen mitjançant una solució tamponada de formol al 10% durant 24 hores a 4°C. A continuació s'inclouen en parafina (inclusor tipus Histokinette) i se n'obtenen seccions (3 μ m) amb l'ajud d'un microtom, les quals posteriorment es desparafinen i es processen.

Les seccions s'incuben durant tota la nit a 4°C amb els anticossos corresponents: contra INF- β (1:500), contra IGF-I (1:50), contra insulina (1:100), contra glucagó (1:4500), contra somatostatina (1:750) i contra polipèptid pancreàtic (1:2000). Posteriorment s'incuben amb els corresponents anticossos secundaris contra IgG de conill o de conill porquí. Com a cromogen s'utilitza la diaminobenzidina (DAB). Per acabar, els talls es contrasten amb Mayer's hematoxilina.

Per la detecció immunohistoquímica de CD4 i CD8 l'obtenció de les seccions no es realitza com en el cas anterior. Els pàncrees dels ratolins es fixen amb paraformaldehid (PFA) al 2% durant 4 hores a 4°C. Posteriorment es deixen en sucrosa al 30% a 4°C durant tota la nit. L'endemà es congelen directament en un bany amb acetona i neu carbònica. S'inclouen en OCT i es guarden a -80°C. Les seccions (5 µm) es realitzen amb un criostat. Posteriorment, les seccions es fixen en els portaobjectes, es bloquejen i s'incuben amb els anticossos corresponents: anticòs contra CD4 (1:300) i contra CD8 (1:300). Tots els anticossos utilitzats són els descrits anteriorment en la part de Materials.

2.6.1. Morfometria del pàncrees. Determinació massa cèl·lula β.

La immunohistoquímica dels pàncrees es realitza mitjançant la tècnica d'immuno-peroxidasa indirecta. L'anticòs primari és un anticòs policlonal contra insulina porcina produït en conill porquí, a una dil·lució 1:100 en PBS. La incubació de la mostra amb l'anticòs primari es du a terme a 30 minuts a temperatura ambient i es finalitza amb tres rentats amb PBS. L'anticòs secundari és un anticòs policlonal contra IgG de conill porquí produït en conill, el qual porta conjugat l'enzim peroxidasa, a una dil·lució 1:100 en PBS. Després de la incubació (30 minuts a temperatura ambient) es renta 3 vegades amb PBS i s'hi afegeix el cromògen (DAB). Finalment, es contrasta amb hematoxilina, deixant assecar les mostres a 37°C durant unes hores.

Mitjançant la immunodetecció de la insulina es delimita l'àrea de la cèl·lula β del pàncrees. El percentatge de cèl·lula β del pàncrees es calcula dividint el sumatori de les àrees que presentaven positivitat per la insulina en una secció de pàncrees per l'àrea total de la secció i multiplicant aquesta relació per 100. La massa de cèl·lula β es calcula multiplicant el pes del pàncrees pel percentatge de l'àrea de cèl·lula β.

Per aquestes anàlisis morfomètriques les immunohistoquímiques d'insulina es realitzen en 3 portaobjectes amb 3 seccions seriades (3 µm) cadascún, separats cada un dels portaobjectes per unes 100 µm (diàmetre mig aproximat d'un illot de ratolí), d'aquesta manera s'eviten les variacions degudes a les diferents zones del pàncrees.

Per la mesura de les àrees s'utilitza un microscopi Nikon Eclipse E800 (Nikon Corp., Tokio, Japó) connectat a una càmera digital Soft Imaging Systems model ColorView II, monitor a color i a un sistema informàtic d'anàlisis d'imatges (analySIS3.0, SoftImaging System Corp.,

Lakewood, Co). L'àrea de la secció es determina a x10 augments i l'àrea dels illots es determina a x100 augments. El sistema es calibra per obtenir els resultats en mil·límetres i micròmetres, respectivament.

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

Per l'anàlisi de l'apoptosis es realitzen tres anàlisis immunohistoquímiques diferents: anti-Fas, anti-Bad i TUNEL. En tots tres casos els pàncrees es fixen mitjançant una solució tamponada de formol al 10% durant 24 hores a 4°C. A continuació s'inclouen en parafina i se n'obtenen seccions (3 μ m) amb l'ajud d'un microtom, les quals posteriorment es desparafinen i processen.

Per realitzar les anàlisis immunohistoquímiques anti-Fas i anti-Bad les mostres es desparafinen i es renten en PBS 1x. Per tal de desemascarar els antígens es fa un tractament a les mostres, previ a la immunohistoquímica; Les mostres es posen en tampó citrat trisòdic 0,01 M en ebullició, es tanquen les mostres en el forn i es fa bullir una segona vegada. Quan arriba a ebullició per segon cop s'apaga el forn i es deixa dins durant 4 minuts. Passat aquest temps es deixen les mostres dins del tampó citrat trisòdic a temperatura ambient durant uns 20-30 minuts. Es tornen a rentar amb PBS 1x i s'incuben amb els anticossos corresponents durant tota la nit a 4°C: anticòs contra Fas (1:30) o anticòs contra Bad (1:500). A continuació s'incuben amb els corresponents anticossos secundaris contra IgG de conill o de cabra biotinilats i amb el complex ABC.

Per realitzar la immunohistoquímica de TUNEL, les mostres es desparafinen. Seguidament es tracten amb Proteinasa K (10 μ g/ml) amb Tris/HCl, pH 7.6, uns 10 min a 37°C i es permeabilitzen les mostres amb Triton X (0.1%) amb PBS durant 2 min. Finalment, es realitza una doble tinció per detectar apoptosi en les cèl·lules β , utilitzant un marcatge terminal amb dideoxinucleòtids dUTP mitjançada per dideoxinulceotiltransferasa (TdT), kit de detecció de mort cel·lular In situ (Roche), i anticossos de conill contra glucagó (1:2000), de conill contra somatostatina (1:750) i de conill contra polipèptid pancreàtic (1:2000). Com a anticòs secundari pel coctail s'utilitza un anticòs de cabra contra conill marcat amb biotina (1:200) i streptavidina marcat amb TEXAS RED (1:100). A més es contrasten les mostres amb Hoechst (33258) per descartar falsos positius i assegurar que són nuclis i no eritròcits.

2.6.3. Anàlisi del grau d'insulitis.

Per determinar el grau d'infiltració dels illots les seccions del pàncrees s'incuben amb un anticòs anti-insulina (1:100) i es contrasten amb hematoxilina. Per aquestes anàlisis morfològiques les immunohistoquímiques d'insulina es realitzen en 3 portaobjectes amb 3 seccions seriades (3 µm) cadascún, separats cada un dels portaobjectes per unes 100 µm (diàmetre mig aproximat d'un illot de ratolí), d'aquesta manera s'eviten les variacions degudes a les diferents zones del pàncrees. Posteriorment es conten el número d'illots totals a cada secció i el número d'illots infiltrats, seguint el següent criteri: periinsulitis quan hi ha una infiltració <25%, insulitis amb una infiltració >25% i <50% i insulitis severa quan presenten un grau >50%. Les dades s'expressen com el percentatge del grau d'infiltració pel total d'illots.

2.7. CÀLCULS ESTADÍSTICS.

Els resultats s'expressen com a mitja \pm error estàndard de la mitja. La comparació de resultats es realitza mitjançant la t de Student de dades no aparellades. Les diferències es consideren estadísticament significatives amb * $p < 0.05$ i ** $p < 0.01$.

FULLA DE REPOSICIÓ D'ESTOCS / ADQUISICIÓ DE MATERIAL FUNGIBLENom del sol·licitant: Data:

	QUANTITAT		Referència	Nom Producte	Companyia	Observacions
	Qty/vial ⁽¹⁾	Nº vials				
1		1		Pacl	New England	
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

⁽¹⁾ Quantitat de producte per vial: Unitats d'activitat, grams, litres, Ci, unitats de producte que hi ha en un envàs de producte.

Observacions generals:

- Adams, T.E., Alpert, S. and Hanahan, D. (1987) Non-tolerance and autoantibodies to a transgenic self antigen expressed in pancreatic beta cells. *Nature*, **325**: 223-228.
- Adorini, L. (1999) Interleukin-12, a key cytokine in Th1-mediated autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci*, **55**: 1610-1625.
- Adorini, L., Gregori, S. and Harrison, L.C. (2002) Understanding autoimmune diabetes: Insights from mouse models. *Trends Mol Med*, **8**: 31-38.
- Aguet, M. (1980) High-affinity binding of 125I-labelled mouse interferon to a specific cell surface receptor. *Nature*, **284**: 459-461.
- Allison, J., Campbell, I.L., Morahan, G., Mandel, T.E., Harrison, L.C. and Miller, J.F. (1988) Diabetes in transgenic mice resulting from over-expression of class I histocompatibility molecules in pancreatic beta cells. *Nature*, **333**: 529-533.
- Allison, J., Harrison, L.C., Campbell, I.L. and Miller, J.F. (1990) Major histocompatibility complex molecules and the beta cell: Inferences from transgenic models. *Curr Top Microbiol Immunol*, **156**: 121-135.
- Allison, J., Malcolm, L., Chosich, N. and Miller, J.F. (1992) Inflammation but not autoimmunity occurs in transgenic mice expressing constitutive levels of interleukin-2 in islet beta cells. *Eur J Immunol*, **22**: 1115-1121.
- Andersson, A., Forsgren, S., Soderstrom, A. and Holmberg, D. (1991) Monoclonal, natural antibodies prevent development of diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *J Autoimmun*, **4**: 733-742.
- Andreoletti, L., Hober, D., Hober-Vandenberghe, C., Belaich, S., Vantyghem, M.C., Lefebvre, J. and Wattre, P. (1997) Detection of coxsackie B virus RNA sequences in whole blood samples from adult patients at the onset of Type I diabetes mellitus. *J Med Virol*, **52**: 121-127.
- Araki, E., Lipes, M.A., Patti, M.E., Bruning, J.C., Haag, B., 3rd, Johnson, R.S. and Kahn, C.R. (1994) Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*, **372**: 186-190.
- Ashcroft, S.J. (1980) Glucoreceptor mechanisms and the control of insulin release and biosynthesis. *Diabetologia*, **18**: 5-15.
- Atkinson, M.A. and Leiter, E.H. (1999) The NOD mouse model of Type 1 diabetes: As good as it gets? *Nat Med*, **5**: 601-604.
- Atkinson, M.A. and Eisenbarth, G.S. (2001) Type 1 diabetes: New perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*, **358**: 221-229.
- Baekkeskov, S., et al. (1990) Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the gaba-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*, **347**: 151-156.

- Baekkeskov, S., Nielsen, J.H., Marnier, B., Bilde, T., Ludvigsson, J. and Lernmark, A. (1982) Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature*, **298**: 167-169.
- Baker, J., Liu, J.P., Robertson, E.J. and Efstratiadis, A. (1993) Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, **75**: 73-82.
- Bedoya, F.J., Solano, F. and Lucas, M. (1996) N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia*, **52**: 344-347.
- Beer, S.F., Heaton, D.A., Alberti, K.G., Pyke, D.A. and Leslie, R.D. (1990) Impaired glucose tolerance precedes but does not predict insulin-dependent diabetes mellitus: a study of identical twins. *Diabetologia*, **33**: 497-502.
- Bell, G.I. and Polonsky, K.S. (2001) Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature*, **414**: 788-791.
- Bonner-Weir, S., Baxter, L.A., Schuppin, G.T. and Smith, F.E. (1993) A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes*, **42**: 1715-1720.
- Bonnevie-Nielsen, V., et al. (2000) The antiviral 2',5'-oligoadenylate synthetase is persistently activated in type 1 diabetes. *Clin Immunol*, **96**: 11-18.
- Bortell, R., Kanaitzuka, T., Stevens, L.A., Moss, J., Mordes, J.P., Rossini, A.A. and Greiner, D.L. (1999) The RT6 (Art2) family of ADP-ribosyltransferases in rat and mouse. *Mol Cell Biochem*, **193**: 61-68.
- Boscà, L., Bodelon, O.G., Hortelano, S., Casellas, A. and Bosch, F. (2000) Anti-inflammatory action of type I interferons deduced from mice expressing interferon beta. *Gene Ther*, **7**: 817-825.
- Bottazzo, G.F., Florin-Christensen, A. and Doniach, D. (1974) Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*, **2**: 1279-1283.
- Branca, A.A. and Baglioni, C. (1981) Evidence that types I and II interferons have different receptors. *Nature*, **294**: 768-770.
- Bruning, J.C., Winnay, J., Cheatham, B. and Kahn, C.R. (1997) Differential signaling by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in IRS-1-deficient cells. *Mol Cell Biol*, **17**: 1513-1521.
- Burstein, D., Mordes, J.P., Greiner, D.L., Stein, D., Nakamura, N., Handler, E.S. and Rossini, A.A. (1989) Prevention of diabetes in BB/Wor rat by single transfusion of spleen cells. Parameters that affect degree of protection. *Diabetes*, **38**: 24-30.
- Castrillo, A., Bodelon, O.G. and Bosca, L. (2000) Inhibitory effect of IGF-I on type 2 nitric oxide synthase expression in Ins-1 cells and protection against activation-dependent apoptosis: Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetes*, **49**: 209-217.

- Chakrabarti, D., Hultgren, B. and Stewart, T.A. (1996) IFN-alpha induces autoimmune T cells through the induction of intracellular adhesion molecule-1 and B7.2. *J Immunol*, **157**: 522-528.
- Chandra, J., Zhivotovsky, B., Zaitsev, S., Juntti-Berggren, L., Berggren, P.O. and Orrenius, S. (2001) Role of apoptosis in pancreatic beta-cell death in diabetes. *Diabetes*, **50 Suppl 1**: S44-47.
- Cheatham, B. and Kahn, C.R. (1995) Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev*, **16**: 117-142.
- Chervonsky, A.V., Wang, Y., Wong, F.S., Visintin, I., Flavell, R.A., Janeway, C.A., Jr. and Matis, L.A. (1997) The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell*, **89**: 17-24.
- Christianson, S.W., Shultz, L.D. and Leiter, E.H. (1993) Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes*, **42**: 44-55.
- Cockfield, S.M., Ramassar, V., Urmson, J. and Halloran, P.F. (1989) Multiple low dose streptozotocin induces systemic MHC expression in mice by triggering T cells to release IFN-gamma. *J Immunol*, **142**: 1120-1128.
- Daniel, D. (1994) Epitope specificity cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from the NOD mouse. *Eur J Immunol*, **25**: 1056 - 1062.
- Darville, M.I. and Eizirik, D.L. (2001) Cytokine induction of fas gene expression in insulin-producing cells requires the transcription factors NF-kappaB and C/EBP. *Diabetes*, **50**: 1741-1748.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M.E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell*, **91**: 231-241.
- Daughaday, W.H. and Rotwein, P. (1989) Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev*, **10**: 68-91.
- Deltour, L., Leduque, P., Paldi, A., Ripoche, M.A., Dubois, P. and Jami, J. (1991) Polyclonal origin of pancreatic islets in aggregation mouse chimaeras. *Development*, **112**: 1115-1121.
- Derynck, R., Remaut, E., Saman, E., Stanssens, P., De Clercq, E., Content, J. and Fiers, W. (1980) Expression of human fibroblast interferon gene in Escherichia coli. *Nature*, **287**: 193-197.
- Devedjian, J.C., et al. (2000) Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor-II in beta cells develop type 2 diabetes. *J Clin Invest*, **105**: 731-740.
- Dunn JS, M. (1943) Experimental alloxan diabetes in the rat. *NGB, LANCET*, **ii**: 384-387.
- Fantin, V.R., Wang, Q., Lienhard, G.E. and Keller, S.R. (2000) Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **278**: E127-133.

- Finegood, D.T., Scaglia, L. and Bonner-Weir, S. (1995) Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. *Diabetes*, **44**: 249-256.
- Flier, J.S., Usher, P. and Moses, A.C. (1986) Monoclonal antibody to the type I insulin-like growth factor (IGF-I) receptor blocks IGF-I receptor-mediated DNA synthesis: clarification of the mitogenic mechanisms of IGF-I and insulin in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**: 664-668.
- Flodström, M., Tyrberg, B., Eizirik, D.L. and Sandler, S. (1999) Reduced sensitivity of inducible nitric oxide synthase-deficient mice to multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*, **48**: 706-713.
- Foulis, A.K., Farquharson, M.A. and Meager, A. (1987) Immunoreactive alpha-interferon in insulin-secreting beta cells in Type 1 diabetes mellitus. *Lancet*, **2**: 1423-1427.
- Foulis, A.K., McGill, M. and Farquharson, M.A. (1991) Insulinitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man-- macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. *J Pathol*, **165**: 97-103.
- Freiesleben De Blasio, B., Bak, P., Pociot, F., Karlsen, A.E. and Nerup, J. (1999) Onset of Type 1 diabetes: A dynamical instability. *Diabetes*, **48**: 1677-1685.
- Gallaher, B.W., Hille, R., Raile, K. and Kiess, W. (2001) Apoptosis: Live or die--hard work either way! *Horm Metab Res*, **33**: 511-519.
- Geng, L., Solimena, M., Flavell, R.A., Sherwin, R.S. and Hayday, A.C. (1998) Widespread expression of an autoantigen-GAD65 transgene does not tolerize non-obese diabetic mice and can exacerbate disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 10055-10060.
- George, M., Ayuso, E., Casellas, A., Costa, C., Devedjian, J.C. and Bosch, F. (2002) Beta cell expression of IGF-I leads to recovery from Type 1 diabetes. *J Clin Invest*, **109**: 1153-1163.
- Giannoukakis, N., Mi, Z., Rudert, W.A., Gambotto, A., Trucco, M. and Robbins, P. (2000) Prevention of beta cell dysfunction and apoptosis activation in human islets by adenoviral gene transfer of the insulin-like growth factor I. *Gene Ther*, **7**: 2015-2022.
- Graham, J., et al. (1999) Negative association between type 1 diabetes and HLA DQB1*0602- DQA1*0102 is attenuated with age at onset. Swedish Childhood Diabetes Study Group. *Eur J Immunogenet*, **26**: 117-127.
- Greiner, D.L., Rossini, A.A. and Mordes, J.P. (2001) Translating data from animal models into methods for preventing human autoimmune diabetes mellitus: Caveat emptor and primum non nocere. *Clin Immunol*, **100**: 134-143.
- Hagopian, W.A., et al. (1995) Glutamate decarboxylase-, insulin-, and islet cell-antibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children. *J Clin Invest*, **95**: 1505-1511.
- Harrington, E.A., Bennett, M.R., Fanidi, A. and Evan, G.I. (1994) c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *Embo J*, **13**: 3286-3295.

- Haverkos, H.W. (1997) Could the aetiology of IDDM be multifactorial? *Diabetologia*, **40**: 1235-1240.
- Hayakawa, H., Kawarada, Y., Mizumoto, R., Hibasami, H., Tanaka, M. and Nakashima, K. (1996) Induction and involvement of endogenous IGF-I in pancreas regeneration after partial pancreatectomy in the dog. *J Endocrinol*, **149**: 259-267.
- Heath, W.R., Allison, J., Hoffmann, M.W., Schonrich, G., Hammerling, G., Arnold, B. and Miller, J.F. (1992) Autoimmune diabetes as a consequence of locally produced interleukin-2. *Nature*, **359**: 547-549.
- Herold, K.C., Montag, A.G. and Fitch, F.W. (1987) Treatment with anti-T-lymphocyte antibodies prevents induction of insulinitis in mice given multiple doses of streptozocin. *Diabetes*, **36**: 796-801.
- Higuchi, Y., et al. (1992) Expression of a tumor necrosis factor alpha transgene in murine pancreatic beta cells results in severe and permanent insulinitis without evolution towards diabetes. *J Exp Med*, **176**: 1719-1731.
- Hintz, R.L., Clemmons, D.R., Underwood, L.E. and Van Wyk, J.J. (1972) Competitive binding of somatomedin to the insulin receptors of adipocytes, chondrocytes, and liver membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**: 2351-2353.
- Holz, A., Brett, K. and Oldstone, M.B. (2001) Constitutive beta cell expression of IL-12 does not perturb self- tolerance but intensifies established autoimmune diabetes. *J Clin Invest*, **108**: 1749-1758.
- Horwitz, M.S., Fine, C., Ilic, A. and Sarvetnick, N. (2001) Requirements for viral-mediated autoimmune diabetes: beta-cell damage and immune infiltration. *J Autoimmun*, **16**: 211-217.
- Horwitz, M.S., Ilic, A., Fine, C., Rodriguez, E. and Sarvetnick, N. (2002) Presented antigen from damaged pancreatic beta cells activates autoreactive T cells in virus-mediated autoimmune diabetes. *J Clin Invest*, **109**: 79-87.
- Hoshi, M., Nishida, E. and Sakai, H. (1988) Activation of a Ca^{2+} -inhibitable protein kinase that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro by growth factors, phorbol esters, and serum in quiescent cultured human fibroblasts. *J Biol Chem*, **263**: 5396-5401.
- Huang, X., Hultgren, B., Dybdal, N. and Stewart, T.A. (1994) Islet expression of interferon-alpha precedes diabetes in both the BB rat and streptozotocin-treated mice. *Immunity*, **1**: 469-478.
- Huang, X., et al. (1995) Interferon expression in the pancreases of patients with type I diabetes. *Diabetes*, **44**: 658-664.
- Hügl, S.R., White, M.F. and Rhodes, C.J. (1998) Insulin-like growth factor I (IGF-I)-stimulated pancreatic beta-cell growth is glucose-dependent. Synergistic activation of insulin receptor substrate-mediated signal transduction pathways by glucose and IGF-I in INS-1 cells. *J Biol Chem*, **273**: 17771-17779.

Hurbin, A., Dubrez, L., Coll, J.L. and Favrot, M.C. (2002) Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines. *J Biol Chem*, **27**: 27.

Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1987) Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J Interferon Res*, **7**: 429-438.

Iwahashi, H., Hanafusa, T. et al. (1996) Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta-cell line: inhibition by Bcl-2. *Diabetologia*, **39**: 530-536.

Iwakura, Y., Asano, M., Nishimune, Y. and Kawade, Y. (1988) Male sterility of transgenic mice carrying exogenous mouse interferon- beta gene under the control of the metallothionein enhancer-promoter. *Embo J*, **7**: 3757-3762.

Jaeckel, E., Manns, M. and Von Herrath, M. (2002) Viruses and diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, **958**: 7-25.

Jensen, I. (2002) Effect of double-stranded RNA and interferon on the antiviral activity of Atlantic salmon cells against infectious salmon anemia virus and infectious pancreatic necrosis virus. *Fish & Shellfish Immunology*, **13**: 221-241.

Jensen, J., et al. (2000) Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: A role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes*, **49**: 163-176.

Jhun, B.H., Meinkoth, J.L., Leitner, J.W., Draznin, B. and Olefsky, J.M. (1994) Insulin and insulin-like growth factor-I signal transduction requires p21ras. *J Biol Chem*, **269**: 5699-5704.

Jones, J.I., Doerr, M.E. and Clemmons, D.R. (1995) Cell migration: Interactions among integrins, IGFs and IGFbps. *Prog Growth Factor Res*, **6**: 319-327.

Jun, H.S., Yoon, C.S., Zbytniuk, L., van Rooijen, N. and Yoon, J.W. (1999) The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med*, **189**: 347-358.

Kagi, D., Odermatt, B., Seiler, P., Zinkernagel, R.M., Mak, T.W. and Hengartner, H. (1997) Reduced incidence and delayed onset of diabetes in perforin-deficient nonobese diabetic mice. *J Exp Med*, **186**: 989-997.

Kaino, Y., Hirai, H., Ito, T. and Kida, K. (1998) Prevention of diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice by short-term and high-dose IGF-I treatment. *J Pediatr Endocrinol Metab*, **11**: 267-272.

Kantwerk, G., Cobbold, S., Waldmann, H. and Kolb, H. (1987) L3T4 and Lyt-2 T cells are both involved in the generation of low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. *Clin Exp Immunol*, **70**: 585-592.

Kay, T. (2000) Insights from transgenic and gene targeting strategies in Type 1 diabetes in diabetes mellitus., A fundamental and clinical text, 441-454. LeRoith D, O.J.T.S.e. J.B. Lippincott.,

- Kelly, M.A., Mijovic, C.H. and Barnett, A.H. (2001) Genetics of Type 1 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **15**: 279-291.
- Kauffmann-Zeh, A., Rodriguez-Viciana, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J. and Evan, G. (1997) Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature*, **385**: 544-548.
- Kelly, M.A., Mijovic, C.H. and Barnett, A.H. (2001) Genetics of type 1 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **15**: 279-291.
- Khan, R. (1985) The molecular mechanism of insulin action. *Annu Rev Med*, **36**: 429 - 451.
- Kido, Y., Burks, D.J., Withers, D., Bruning, J.C., Kahn, C.R., White, M.F. and Accili, D. (2000) Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest*, **105**: 199-205.
- Kim, K.S., et al. (2002) Modulation of glucocorticoid-induced GAD expression in pancreatic beta- cells by transcriptional activation of the GAD67 promoter and its possible effect on the development of diabetes. *Diabetes*, **51**: 2764-2772.
- Kim, S.K. (2002) Pancreatic islet cell replacement: Successes and opportunities. *Ann N Y Acad Sci*, **961**: 41-43.
- Knowler, W.C., Barrett-Connor, E., Fowler, S.E., Hamman, R.F., Lachin, J.M., Walker, E.A. and Nathan, D.M. (2002) Reduction in the incidence of Type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*, **346**: 393-403.
- Kolb-Bachofen, V., Epstein, S., Kiesel, U. and Kolb, H. (1988) Low-dose streptozocin-induced diabetes in mice. Electron microscopy reveals single-cell insulinitis before diabetes onset. *Diabetes*, **37**: 21-27.
- Kulkarni, R.N., Holzenberger, M., Shih, D.Q., Ozcan, U., Stoffel, M., Magnuson, M.A. and Kahn, C.R. (2002) Beta-cell-specific deletion of the Igf-1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter beta-cell mass. *Nat Genet*, **31**: 111-115.
- Kunzi M.S., R.P.P.e.a. (2000) IFN α , IFN β , and IFN ω ligands. *Cytokine Growth factor Rev*, **11**: 627-639.
- Laffranchi, R. and Spinas, G.A. (1997) Interferon-gamma inhibits insulin release and induces cell death in the pancreatic beta-cell line INS-1 independently of nitric oxide production. *Exp Cell Res*, **237**: 217-222.
- Lan, M.S., Wasserfall, C., Maclaren, N.K. and Notkins, A.L. (1996) IA-2, a transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 6367-6370.
- Le Roith, D. (1997) Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med*, **336**: 633-640.
- Le Roith, D., Parrizas, M. and Blakesley, V.A. (1997) The insulin-like growth factor-I receptor and apoptosis. Implications for the aging process. *Endocrine*, **7**: 103-105.

- Lee, M.S., Wogensen, L., Shizuru, J., Oldstone, M.B. and Sarvetnick, N. (1994) Pancreatic islet production of murine interleukin-10 does not inhibit immune-mediated tissue destruction. *J Clin Invest*, **93**: 1332-1338.
- Leslie, D., Lipsky, P. and Notkins, A.L. (2001) Autoantibodies as predictors of disease. *J Clin Invest*, **108**: 1417-1422.
- Leslie, R.D., Atkinson, M.A. and Notkins, A.L. (1999) Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*, **42**: 3-14.
- Like, A.A. and Rossini, A.A. (1976) Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: New model of diabetes mellitus. *Science*, **193**: 415-417.
- Lipes, M.A. and Eisenbarth, G.S. (1990) Transgenic mouse models of Type I diabetes. *Diabetes*, **39**: 879-884.
- Liu, J.P., Baker, J., Perkins, A.S., Robertson, E.J. and Efstratiadis, A. (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*, **75**: 59-72.
- Lo, D., Burkly, L.C., Widera, G., Cowing, C., Flavell, R.A., Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. (1988) Diabetes and tolerance in transgenic mice expressing class II MHC molecules in pancreatic beta cells. *Cell*, **53**: 159-168.
- Lowe, W.L. (1998) Chapter 47: Diabetes Mellitus. Principles of Molecular Medicine. J.L. Jameson ed.
- Loweth, A.C., Williams, G.T., James, R.F., Scarpello, J.H. and Morgan, N.G. (1998) Human islets of langerhans express Fas ligand and undergo apoptosis in response to interleukin-1beta and Fas ligation. *Diabetes*, **47**: 727-732.
- Lu, J., et al. (1996) Identification of a second transmembrane protein tyrosine phosphatase, IA-2beta, as an autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus: Precursor of the 37-kDa tryptic fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**: 2307-2311.
- Lukic, M.L., Stosic-Grujicic, S. and Shahin, A. (1998) Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Dev Immunol*, **6**: 119-128.
- Mabley, J.G., Belin, V., John, N. and Green, I.C. (1997) Insulin-like growth factor I reverses interleukin-1beta inhibition of insulin secretion, induction of nitric oxide synthase and cytokine-mediated apoptosis in rat islets of langerhans. *FEBS Lett*, **417**: 235-238.
- Maedler, K., et al. (2002) Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest*, **110**: 851-860.
- Makino, S., Kunimoto, D., Muraok, D., Mizushima, Y., Katagini, K., and Tochino, Y. (1980) Breeding of non-obese, diabetic strain of mice. *Exp. Anim*, **29**: 1-13.
- Makino, S., Harada, M., Kishimoto, Y. and Hayashi, Y. (1986) Absence of insulinitis and overt diabetes in athymic nude mice with NOD genetic background. *Exp Anim*, **35**: 495-499.

Mandrup-Poulsen, T., Helqvist, S., Wogensén, L.D., Molvig, J., Pociot, F., Johannesen, J. and Nerup, J. (1990) Cytokine and free radicals as effector molecules in the destruction of pancreatic beta cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, **164**: 169-193.

Marrack, P., Kappler, J. and Mitchell, T. (1999) Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med*, **189**: 521-530.

Massagué, J. and Czech, M.P. (1982) The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. *J Biol Chem*, **257**: 5038-5045.

Møller, D.E. (2001) New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature*, **414**: 821-827.

Mordes, J.P. (2001) Autoimmune diabetes mellitus in the BB rat, "In "Animal Models of Diabetes: A primer", 1-41. A.A.F.Sima and E.Shafirir, E. Harwood Academic, Amsterdam

Moriwaki, M., et al. (1999) Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset Type I diabetes mellitus. *Diabetologia*, **42**: 1332-1340.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. and Coffman, R.L. (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, **136**: 2348-2357.

Myers, M.A., Mackay, I.R., Rowley, M.J. and Zimmet, P.Z. (2001) Dietary microbial toxins and type 1 diabetes--a new meaning for seed and soil. *Diabetologia*, **44**: 1199-1200.

Nerup, J., et al. (1974) HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet*, **2**: 864-866.

Noorchashm, H., Noorchashm, N., Kern, J., Rostami, S.Y., Barker, C.F. and Najji, A. (1997) B-cells are required for the initiation of insulinitis and sialitis in nonobese diabetic mice. *Diabetes*, **46**: 941-946.

Notkins, A.L. and Lernmark, A. (2001) Autoimmune type 1 diabetes: Resolved and unresolved issues. *J Clin Invest*, **108**: 1247-1252.

Notkins, A.L. (2002) Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. *J Biol Chem*, **277**: 43545-43548.

O'Brien, B.A., Harmon, B.V., Cameron, D.P. and Allan, D.J. (1996) Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *J Pathol*, **178**: 176-181.

Ogawa, M.e.a. (1985) The inhibitory effect of neonatal thymectomy on the incidence of insulinitis in non-obese diabetes (NOD) mice. *Biomed Res*, **6**: 103-106.

Ohashi, P.S., et al. (1991) Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell*, **65**: 305-317.

Oldstone, M.B., Nerenberg, M., Southern, P., Price, J. and Lewicki, H. (1991) Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: Role of anti-self (virus) immune response. *Cell*, **65**: 319-331.

- Palmer, J.P. (1987) Insulin autoantibodies: their role in the pathogenesis of IDDM. *Diabetes Metab Rev*, **3**: 1005-1015.
- Párrizas, M. and LeRoith, D. (1997) Insulin-like growth factor-1 inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xl gene product. *Endocrinology*, **138**: 1355-1358.
- Patti, M.E. and Kahn, C.R. (1998) The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, **9**: 89-109.
- Pelegrin, M., et al. (1998) Evidence from transgenic mice that interferon-beta may be involved in the onset of diabetes mellitus. *J Biol Chem*, **273**: 12332-12340.
- Pende, M., et al. (2000) Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature*, **408**: 994-997.
- Pennline, K.J., Roque-Gaffney, E. and Monahan, M. (1994) Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol Immunopathol*, **71**: 169-175.
- Peretz, S., Kim, C., Rockwell, S., Baserga, R. and Glazer, P.M. (2002) IGF1 receptor expression protects against microenvironmental stress found in the solid tumor. *Radiat Res*, **158**: 174-180.
- Peruzzi, F., et al. (1999) Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. *Mol Cell Biol*, **19**: 7203-7215.
- Petrovsky, N., Silva, D., Socha, L., Slattery, R. and Charlton, B. (2002) The role of Fas ligand in beta cell destruction in autoimmune diabetes of NOD mice. *Ann N Y Acad Sci*, **958**: 204-208.
- Picarella, D.E., Kratz, A., Li, C.B., Ruddle, N.H. and Flavell, R.A. (1993) Transgenic tumor necrosis factor (TNF)-alpha production in pancreatic islets leads to insulinitis, not diabetes. Distinct patterns of inflammation in TNF-alpha and TNF-beta transgenic mice. *J Immunol*, **150**: 4136-4150.
- Pickup, J.a.W., G. (1997) Textbook of Diabetes, Second edition, Volume 1. Series editor Blackwell Science Ltd.
- Pujol-Borrell, R., Todd, I., Doshi, M., Gray, D., Feldmann, M. and Bottazzo, G.F. (1986) Differential expression and regulation of MHC products in the endocrine and exocrine cells of the human pancreas. *Clin Exp Immunol*, **65**: 128-139.
- Rabinovitch, A. (1994) Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? *Diabetes*, **43**: 613-621.
- Rabinovitch, A. (1998) An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev*, **14**: 129-151.
- Rapoport, M.J., et al. (1993) Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med*, **178**: 87-99.

- Rhodes, J., Ivanyi, J. and Cozens, P. (1986) Antigen presentation by human monocytes: Effects of modifying major histocompatibility complex class II antigen expression and interleukin 1 production by using recombinant interferons and corticosteroids. *Eur J Immunol*, **16**: 370-375.
- Roman, L.M., Simons, L.F., Hammer, R.E., Sambrook, J.F. and Gething, M.J. (1990) The expression of influenza virus hemagglutinin in the pancreatic beta cells of transgenic mice results in autoimmune diabetes. *Cell*, **61**: 383-396.
- Rosmalen, J.G., van Ewijk, W. and Leenen, P.J. (2002) T-cell education in autoimmune diabetes: Teachers and students. *Trends Immunol*, **23**: 40-46.
- Rossini, A.A., Appel, M.C., Williams, R.M. and Like, A.A. (1977) Genetic influence of the streptozotocin-induced insulinitis and hyperglycemia. *Diabetes*, **26**: 916-920.
- Ruderman, N.B., Kapeller, R., White, M.F. and Cantley, L.C. (1990) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**: 1411-1415.
- Saltiel, A.R. (2001) New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell*, **104**: 517-529.
- Saltiel, A.R. and Kahn, C.R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, **414**: 799-806.
- Sandler, S. (1983) Abstracts of Uppsala Disertstions from Faculty of Medecine, University of Uppsala, Sweden., Series. Editor.
- Sarvetnick, N., Liggitt, D., Pitts, S.L., Hansen, S.E. and Stewart, T.A. (1988) Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon-gamma. *Cell*, **52**: 773-782.
- Sarvetnick, N., et al. (1990) Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta-cell expression of interferon-gamma. *Nature*, **346**: 844-847.
- Schnedl, W.J., Ferber, S., Johnson, J.H. and Newgard, C.B. (1994) STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2- expressing cells. *Diabetes*, **43**: 1326-1333.
- Serreze, D.V., Hamaguchi, K. and Leiter, E.H. (1989) Immunostimulation circumvents diabetes in NOD/Lt mice. *J Autoimmun*, **2**: 759-776.
- Schrezenmeir, J. and Jagla, A. (2000) Milk and diabetes. *J Am Coll Nutr*, **19**: 176S-190S.
- Smith, F.E., Rosen, K.M., Villa-Komaroff, L., Weir, G.C. and Bonner-Weir, S. (1991) Enhanced insulin-like growth factor I gene expression in regenerating rat pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**: 6152-6156.
- Somoza, N., et al. (1994) Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. Changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V beta usage, and cytokine profile. *J Immunol*, **153**: 1360-1377.

- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. and Schreiber, R.D. (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, **67**: 227-264.
- Stassi, G., et al. (1995) Expression of apoptosis-inducing CD95 (Fas/Apo-1) on human beta-cells sorted by flow-cytometry and cultured in vitro. *Transplant Proc*, **27**: 3271-3275.
- Steiner (1989) *Endocrinology*, p.1263. Series. Editor. W.B. Saunders Philadelphia, Philadelphia
- Stephens, L.A., Thomas, H.E., Ming, L., Grell, M., Darwiche, R., Volodin, L. and Kay, T.W. (1999) Tumor necrosis factor-alpha-activated cell death pathways in NIT-1 insulinoma cells and primary pancreatic beta cells. *Endocrinology*, **140**: 3219-3227.
- Stewart, T.A., Hultgren, B., Huang, X., Pitts-Meek, S., Hully, J. and MacLachlan, N.J. (1993) Induction of Type I diabetes by interferon-alpha in transgenic mice. *Science*, **260**: 1942-1946.
- Tamatani, M., Ogawa, S. and Tohyama, M. (1998) Roles of Bcl-2 and caspases in hypoxia-induced neuronal cell death: A possible neuroprotective mechanism of peptide growth factors. *Brain Res Mol Brain Res*, **58**: 27-39.
- Tamemoto, H., et al. (1994) Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*, **372**: 182-186.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (1997) Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, **20**: 1183-1197.
- Tisch, R. and McDevitt, H. (1996) Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell*, **85**: 291-297.
- Todd, J.A., Farrall, M. (1996) Panning for gold: genome-wide scanning for linkage in type 1 diabetes. *Hum Mol Genet*, **5**: 1443- 1448.
- Tough, D.F., Borrow, P. and Sprent, J. (1996) Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science*, **272**: 1947-1950.
- Tuomilehto, J., et al. (1992) Comparison of the incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in childhood among five Baltic populations during 1983-1988. *Int J Epidemiol*, **21**: 518-527.
- Turk, J., Corbett, J.A., Ramanadham, S., Bohrer, A. and McDaniel, M.L. (1993) Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun*, **197**: 1458-1464.
- Tuttle, R.L., et al. (2001) Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha. *Nat Med*, **7**: 1133-1137.
- Van den Brande, J.L., Hoogerbrugge, C.M., Beyreuther, K., Roepstorff, P., Jansen, J. and van Buul-Offers, S.C. (1990) Isolation and partial characterization of IGF-like peptides from Cohn fraction IV of human plasma. *Acta Endocrinol (Copenh)*, **122**: 683-695.

- Van Schravendijk, C.F., Heylen, L., Van den Brande, J.L. and Pipeleers, D.G. (1990) Direct effect of insulin and insulin-like growth factor-I on the secretory activity of rat pancreatic beta cells. *Diabetologia*, **33**: 649-653.
- Verge, C.F., et al. (1996) Prediction of Type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/ia-2 autoantibodies. *Diabetes*, **45**: 926-933.
- Vilcek, J. (2000) Cytokines engaged in antiviral action, macrophage activation, angiogenesis, and regulation of cell growth and differentiation. *Cytokine Growth factor Rev*, **11**: 615-625.
- Whalen, B.J., Greiner, D.L., Mordes, J.P. and Rossini, A.A. (1994) Adoptive transfer of autoimmune diabetes mellitus to athymic rats: Synergy of CD4+ and CD8+ T cells and prevention by RT6+ T cells. *J Autoimmun*, **7**: 819-831.
- White, M.F. (1998) The irs-signalling system: A network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem*, **182**: 3-11.
- Wilkinson, M.F. and Morris, A.G. (1986) Preparation and partial purification of human interferon delta. *Methods Enzymol*, **119**: 96-102.
- Wilson, G.L., Patton, N.J., McCord, J.M., Mullins, D.W. and Mossman, B.T. (1984) Mechanisms of streptozotocin- and alloxan-induced damage in rat B cells. *Diabetologia*, **27**: 587-591.
- Withers, D.J., et al. (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, **391**: 900-904.
- Withers, D.J., Burks, D.J., Towery, H.H., Altamuro, S.L., Flint, C.L. and White, M.F. (1999) Irs-2 coordinates Igf-1 receptor-mediated beta-cell development and peripheral insulin signalling. *Nat Genet*, **23**: 32-40.
- Wolf, E., Spencer, K.M. and Cudworth, A.G. (1983) The genetic susceptibility to type 1 (insulin-dependent) diabetes: Analysis of the HLA-DR association. *Diabetologia*, **24**: 224-230.
- Wong, F.S., et al. (1999) Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library. *Nat Med*, **5**: 1026-1031.
- Xuan, S., et al. (2002) Defective insulin secretion in pancreatic beta cells lacking type 1 IGF receptor. *J Clin Invest*, **110**: 1011-1019.
- Yang, Z., et al. (2002) Suppression of autoimmune diabetes by viral IL-10 gene transfer. *J Immunol*, **168**: 6479-6485.
- Yoon, J.W., Jun, H.S. and Santamaria, P. (1998) Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity*, **27**: 109-122.
- Yoon, J.W. and Jun, H.S. (1998) Insulin-dependent diabetes mellitus., *Encyclopedia of immunology*, 1390-1398. Delves, I.M.R.P.J. Academic Press, London, UK.
- Yoon, J.W. and Jun, H.S. (2001) Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci*, **928**: 200-211.

Zapf, J., Schoenle, E. and Froesch, E.R. (1978) Insulin-like growth factors I and II: some biological actions and receptor binding characteristics of two purified constituents of nonsuppressible insulin-like activity of human serum. *Eur J Biochem*, **87**: 285-296.

Zekzer, D., et al. (1998) GAD-reactive CD4+ Th1 cells induce diabetes in NOD/SCID mice. *J Clin Invest*, **101**: 68-73.

Zhang, Q., Berggren, P.O., Hansson, A. and Tally, M. (1998) Insulin-like growth factor-I-induced DNA synthesis in insulin-secreting cell line RINm5F is associated with phosphorylation of the insulin-like growth factor-I receptor and the insulin receptor substrate-2. *J Endocrinol*, **156**: 573-581.

Zielasek, J., Burkart, V., Naylor, P., Goldstein, A., Kiesel, U. and Kolb, H. (1990) Interleukin-2-dependent control of disease development in spontaneously diabetic BB rats. *Immunology*, **69**: 209-214.

Zimmet, P., Alberti, K.G. and Shaw, J. (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, **414**: 782-787.