



Universitat Autònoma de Barcelona

FACULTAT DE VETERINÀRIA

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

**ESTUDI EN ANIMALS TRANSGÈNICS DEL
PAPER DE LA SOBREEXPRESSIÓ D'IGF-II EN
CÈL·LULA β EN EL DESENVOLUPAMENT DE
DIABETIS MELLITUS**

ARIANA SALAVERT i LARROSA

Memòria presentada per la llicenciada ARIANA SALAVERT i LARROSA per optar al grau de Doctor en Bioquímica.

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

ARIANA SALAVERT i LARROSA

FÀTIMA BOSCH i TUBERT

**Maig del 2007
BELLATERRA**

*“El viaje más importante que podemos hacer en la vida,
es el de conocer a otros en el camino”.*

A Antonio, mi compañero de viaje.

AGRAÏMENTS

El millor, sense dubte, de tota aquesta Tesis Doctoral ha estat el grup de persones amb qui he compartit espais, projectes, situacions, il·lusions i sobretot hores. Moltes gràcies a tots.

En primer lloc voldria donar les gràcies a la Dra. Fàtima Bosch per haver-me donat la oportunitat de realitzar la Tesi Doctoral en el seu grup d'investigació. Per la confiança, l'entusiasme i la il·lusió que ha demostrat sempre en aquest projecte.

Vull donar les gràcies de forma molt especial a dues persones, l'ajuda i companyia de les quals ha sigut indispensable: A l'Alba per representar el principi i l'empenta final de tot aquest procés, per deixar-me ser la teva ombra, per sobreprotegir-me en molts *Lab meetings*, per animar-me sempre i sobretot per la confiança que sempre has dipositat en mi, tant a nivell laboral com personal, moltes gràcies Alba. A la Judith per representar el dia a dia de tots aquests anys. Gràcies per la teva amistat, per compartir juntes il·lusions, problemes, piscines, viatges, moltes hores d'*insulin release*, frustracions i alegries. Gràcies per l'Aleix i per portar-me el llop a casa! Un petó guapa.

A la Vero, per la seva ajuda incondicional. Per tenir tanta empenta i ganes de treballar a la feina, com energia i ganes de menjar-se el món a fora d'ella. Perquè sense tu, les *pancreatic girls* no serien el que són, gràcies calagurritana. Al dos *seniors* del laboratori, al Sergio per la seva amistat, pels seus *piques* amb l'Antonio i per estar sempre al nostre costat; i al Miquel pels seus bons consells, els seus ànims i per deixar de ser un antisocial en els moments que més il·lusió ens fa compartir amb tu... vine al meu sopar si us plau! A la Maria, per estar sempre alegre i disposada a donar un cop de mà, per preocupar-te sempre de nosaltres, i per ajudar-nos tant. A la Marta per la infinitat de feina feta, per la seva rapidesa i bon humor davant les llargues llistes de *morfos*; t'hauré de fer un monument Marta. A la Mireia pels nombrosos minuts d'entre punt i punt de GTT compartits, per fer sempre agradables aquestes estones. A la Iveta per compartir moltes etapes importants de la nostra vida, gràcies per formar també part d'aquesta. Al Carles pels anys que fa que ens coneixem. Procura que les coses no t'angoixin i et treguin tant el son, vals molt més del que et valoren. A l'Albert per ser-hi sempre que se'l necessita i per estar disposat a solucionar tots els problemes; sort i cuida molt a la Judith. Al Xavi, Mr. Ipod per amenitzar-nos sempre la poiatà amb música. Per ser la persona que conec amb més facilitat per adaptar qualsevol cançó al català i fer-ne de qualsevol cosa una cançó; gràcies pels teus *piropos*, i pel teu suport, ànim. A l'equip d'ulls per compartir frustracions a l'hora d'obtenir quantitats òptimes de les nostres matèries primes! a la Vicky per ser tan carinyosa i per les hores d'estabulari també compartides en els inicis. A la Pilar i l'Albert per la seva simpatia i hores de dinar compartides. Pilar ara ja no tinc excusa per no venir a *bossu*. Al David, per ser com ets, però sobretot per ja no ser-ho tant com ho

eres al principi; la meua poiatà sobretot, t'ho agraeix. A Chris per apuntar-se a todas y hacer un equipo explosivo con Mr. Callejas. A Luca per dejarse llevar por David y ofrecernos momentos tan inolvidables como el Día S. A la Sylvie i la Tura pels seus consells i paciència amb tots nosaltres. Gràcies per deixar-te abraçar Tura. A l'Edu i la Sabrina per donar la seva ajuda sempre que ha fet falta. Gràcies. Als que ja no hi són, Joel, Àlex, Marisa, Glòria, pels bons moments compartits. I a aquells amb qui hi he pogut compartir menys, Antonella i l'Edu "de la Vicky". A l'inestimable suport tècnic del Carles Ros, la Jenny i la Lídia, i de l'Anna Vilalta els primers anys. Gràcies per "suportar" les meves correccions i presses amunt i avall del laboratori. Al quartet de microinjecció per aportar sempre un toc d'alegria. A l'equip del SER per la feina feta, i al seu director per ensenyar-nos com s'han de fer i com no s'haurien d'haver fet algunes coses.

A la gent de la 4^a i la 5^a pel seu companyarisme, el seu interès i el seu suport. Especialment al Jose i a la Susana per la seva amistat. Als del passadís de Bioquímica pel temps i moments compartits mentre estàvem a Veterinària. Gràcies també a tot el personal d'administració per la seva contribució en el bon funcionament del Departament de Bioquímica i del CBATEG.

Als meus pares, per animar-me i encoratjar-me. Per estar sempre al meu costat i demostrar-me lo molt que em valoren i m'estimen, MOLTES GRÀCIES. Als meus germans per aguantar-me estoicament fins que vaig marxar de casa, i encara ara cada vegada que hi torno o truco. Gràcies guapíssims! Als meus avis i a la resta de la meua família pel seu interès i suport incondicional.

A l'Antonio per compartir-ho tot cada dia, per ser un gran amic i company de viatge. Per tot el que hem fet i aconseguit junts, i per tot el que encara ens queda per fer! Per ensenyar-me el secret de la joventut eterna: jugar. T'estimo Antonio. Gràcies. A Herminio, Antonia y familia por su cariño.

Als tots amics que, tot i no compartir hores de feina, han patit els alts i baixos, estressos i angoixes d'aquesta tesi. Moltes gràcies a tots!

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

ABREVIATURES

ABC	complex abidina-biotina
ADP	adenosina-5'-difosfat
ATP	adenosina-5'-trifosfat
APC	cèl·lula presentadora d'antigen (<i>Antigen presenting cell</i>)
BAD	proteïna pro-apoptòtica
BB	rates Biobreeding Worcester
Beta2/NeuroD1	<i>beta E-box transactivator 2/Neurogenic differentiation 1</i>
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	albúmina sèrica bovina
cAMP	adenosina-5'-monofosfat cíclica
CB4	virus Cosakie B4
Cdk4	Ciclina depenent de quinasa 4
cDNA	DNA còpia
CIITA	<i>Class II transactivator</i>
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
Con	control
cpm	contes per minut
CRE	element de resposta al cAMP
DAG	diacilglicerol
dATP	desoxiadenosina-5'-trifosfat
dCTP	desoxicitidina-5'-trifosfat
dGTP	desoxiguanosina-5'-trifosfat
dL	decilitres
DAB	3'3'-diaminobenzidina
DNA	àcid desoxirribonucleic
EBV	virus Epstein-Barr
EDTA	etilendiaminotetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMC	virus de la encefalomiocarditis
Fas	Fas, receptor de mort cel·lular
FasL	Fas lligand
FoxA2	<i>Forkhead box A2</i>
FITC	<i>fluorecein isothiocyanate</i>
g	grams
G-6-Pasa	Glucosa-6-fosfatasa

GAD	àcid glutàmic decarboxilasa
GH	hormona de creixement
GK	glucoquinasa
GK	rates Goto-Kakisaki
GLP-1	<i>glucagon-like peptide 1</i>
GLUT2	transportador de glucosa de tipus 2
GSIS	<i>Glucose stimulated insulin secretion</i>
GTT	test de tolerància a la glucosa
HGF	factor de creixement d'hepatòcits
hIFN β	interferó beta humà
HLA	antígens leucocitaris humans
HNF1 α	<i>Hepatocyte nuclear factor 1α</i>
HNF3 β	<i>Hepatocyte nuclear factor 3β</i>
HNF6	<i>Hepatocyte nuclear factor 6</i>
HSP	<i>heat-shock proteins</i>
IA-2	molècula semblant a la proteïna tirosina fosfatasa
IAPP	<i>islet amyloid polipeptide</i>
ICA	<i>islet-cell autoantibodies</i>
IDDM	diabetis mellitus dependent d'insulina
Idx1	<i>Islet/duodenum homebox-1</i>
IFN- α	interferó alfa
IFN- β	interferó beta
IFN β /IGF-I	Animals doble transgènics RIP/IFN β i RIP/IGF-I
IFN β /IGF-II	Animals doble transgènics RIP/IFN β i RIP/IGF-II
IFN- γ	interferó gama
IGF-I	factor de creixement similar a la insulina I
IGF-IR	receptor del factor de creixement similar a la insulina I
IGF-II	factor de creixement similar a la insulina II
IGF-II/M6P	receptor de l'IGF-II/Manosa-6-fosfat
IGFBP	proteïnes d'unió a factors de creixement similars a la insulina
IL	interleuquina
iNOS	òxid nítric sintasa
IP3	inositol trifosfat
Ip1f	<i>Insulin promoter factor-1</i>
IR	receptor de la insulina
IRS	substrat del receptor de la insulina

ITT	Test de tolerància a la insulina
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltons
LPS	lipopolisacàrid
mg	mil·ligram
min	minuts/s
ml	mil·lilitre
mM	milimolar
MAPK	activador mitogènic proteïna quinasa
MHC	complex major d'histocompatibilitat
MLD	<i>multiple low dosis</i>
MODY	<i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i>
mRNA	RNA missatger
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinamida-adenina-dinuclòtid fosfat oxidat/reduit
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamida-adenina-dinuclòtid oxidat/reduït
NEFA	àcid gras no esterificat
NF-κB	factor de transcripció nuclear Kappa BN
Ngn3	Neurogenina 3
NK	cèl·lula <i>Natural Killer</i>
NO	òxid nítric
NOD	<i>non obese diabetic</i>
NZO	<i>New Zeland Obese mice</i>
³² P	fòsfor 32
Pax4	<i>Paired box gene 4</i>
Pax6	<i>Paired box gene 6</i>
pb	parells de bases
PBS	tampó fosfato-salí
PCR	reacció en cadena de la polimerasa
PDX-1	<i>pancreatic duodenal homeobox 1 gene</i>
PI-3K	fosfatidil inositol 3 quinasa
PKC	proteïna quinasa C
PKB	proteïna quinasa B
PP	polipèptid pancreàtic
Q-PCR	PCR quantitativa o PCR a temps real
RIA	radioimmunoassaig
RIP	promotor del gen de la insulina de rata
RIP/hIFNβ	gen quimèric promotor RIP – cDNA IFNβ humà

RIP/IGF-I	gen quimèric promotor RIP – cDNA de l'IGF-I murí
RIP/IGF-II	gen quimèric promotor RIP – cDNA de l'IGF-II murí
rpm	revolucions per minut
RNA	àcid ribonucleic
RNasa	ribonucleasa
SDS	dodecilsulfat sòdic
SEM	error estàndard de la mitja
SSC	<i>salini sodiun citrate</i>
SNP	<i>short nucleotide polymorphism</i>
ssDNA	DNA d'esperma de salmó
STF1	<i>Somatostatin transactivating factor-1</i>
STZ	estreptozotocina (2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosourea)1-Ddlucopyranose
TAE	tampó tris-acetat-EDTA
Tc	limfòcit T citotòxic
TdT	dideoxinulceotiltransferasa
TE	tampó tris-EDTA
Tg	transgènic
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
Th	limfòcit T col-laborador (<i>helper</i>)
TNF- α	factor necròtic tumoral α
TNF- β	factor necròtic tumoral β
Tris	tris(hidroximetil)aminometà
TRITC	<i>texas red isothiocyanate</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP nick labeling</i>
IU	unitats internacionals d'activitat enzimàtica
vol	volum
x g	gravetats
ZDF	<i>Zucker diabetic fatty rats</i>

ÍNDEX

I. PRESENTACIÓ	1- 2
II. INTRODUCCIÓ	3- 37
1. LA CÈL·LULA β PRODUCTORA D'INSULINA.	3
1.1. FACTORS QUE CARACTERITZEN LES CÈL·LULES β .	4
1.2. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DEL GEN DE LA INSULINA.	7
1.3. REGULACIÓ DE LA BIOSÍNTESI D'INSULINA.	8
1.4. REGULACIÓ DE LA SECRECIÓ D'INSULINA.	9
1.5. ACCIÓ DE LA INSULINA .	11
2. LA DIABETIS MELLITUS.	13
3. LA DIABETIS MELLITUS NO DEPENENT D'INSULINA (TIPUS 2).	13
3.1. ETAPES EN LA DISFUNCIÓ DE LA CÈL·LULA β DURANT EL PROCÉS DIABÈTIC.	15
3.2. MODELS ANIMALS ESPONTANIS DE DIABETIS TIPUS 2.	17
3.2.1. Animals transgènics que sobreexpressen IGF-II en les cèl·lules β pancreàtiques.	19
4. DIABETIS MELLITUS DEPENENT D'INSULINA (TIPUS 1).	20
4.1. FACTORS IMPLICATS EN EL DESENVOLUPAMENT DE LA DIABETIS TIPUS 1.	20
4.1.1. Factors genètics.	21
4.1.1.1. Locus IDDM1.	21
4.1.1.2. Locus IDDM2.	24
4.1.2. Factors ambientals.	26
4.2. DESTRUCCIÓ AUTOIMMUNE.	27
4.3. MODELS ANIMALS DE DIABETIS TIPUS 1.	29
4.3.1. Animals transgènics models de diabetis tipus 1.	29
4.3.1.1. Animals transgènics que expressen antígens MHC.	29
4.3.1.2. Animals transgènics que expressen citoquines.	30
4.3.1.3. Animals transgènics que expressen IFN β en les cèl·lules β pancreàtiques.	30
4.3.2. Models de diabetis experimental, induïda per estreptozotocina.	31
5. FACTORS DE CREIXEMENT SIMILAR A LA INSULINA (IGFs).	33
5.1 FACTOR DE CREIXEMENT SIMILAR A LA INSULINA-I (IGF-I).	35
5.1.1 Animals transgènics que expressen IGF-I en les cèl·lules β pancreàtiques.	35
5.2. FACTOR DE CREIXEMENT SIMILAR A LA INSULINA-II (IGF-II).	36
5.2.1. Animals transgènics que sobreexpressen IGF-II en les cèl·lules β pancreàtiques.	37
III. OBJECTIUS	38

IV. RESULTATS	39- 79
1. ESTUDI DELS ILLOTS PANCREÀTICS DELS RATOLINS TRANSGÈNICS RIP/IGF-II.	39
1.1. ESTUDI HISTOLÒGIC DELS ILLOTS DELS RATOLINS TRANSGÈNICS RIP/IGF-II.	39
1.2. ESTUDI DE LA CAPACITAT DE SECRECIÓ D'INSULINA DELS RATOLINS IGF-II.	40
1.3. ESTUDI DELS PROCESSOS DE CAPTACIÓ I SECRECIÓ D'INSULINA EN ELS ILLOTS DELS RATOLINS TRANSGÈNICS RIP/IGF-II.	42
1.3.1. Estudi de les proteïnes implicades en el procés de captació de la glucosa.	42
1.3.1.1. Anàlisi de l'expressió de Glut2 en illots de ratolins IGF-II neonats.	43
1.3.2. Estudi de gens implicats en el procés de secreció d'insulina.	44
1.4. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DELS ILLOTS DELS RATOLINS IGF-II.	45
1.4.1. Estudi dels gens relacionats amb el metabolisme de les cèl·lules β i les funcions de captació i secreció d'insulina.	46
1.4.1.1. Estudi de l'expressió de gens regulats per Pdx1 i HNF3 β en les cèl·lules β pancreàtiques.	48
1.4.2. Estudi dels gens relacionats amb les alteracions morfològiques dels illots.	50
1.4.3. Estudi de l'alteració de gens relacionats amb el sistema immunitari.	52
1.4.3.1. Estudi dels nivells d'expressió d'insulina i d'IGF-II a timus.	54
2. ESTUDI DE LA SUSCEPTIBILITAT DELS ANIMALS TRANSGÈNICS RIP/IGF-II AL TRACTAMENT AMB ESTREPTOZOTOCINA (STZ).	56
2.1. ESTUDI DE LA SUSCEPTIBILITAT AL TRACTAMENT AMB 40 mg/Kg STZ.	56
2.1.1. Seguiment de la glucèmia.	57
2.1.2. Determinació dels nivells d'insulina circulant.	58
2.1.3. Determinació de la massa de cèl·lula β .	58
2.1.4. Detecció de l'apoptosi de la cèl·lula β .	60
2.1.5. Detecció de la replicació de la cèl·lula β .	61
2.2. ESTUDI DE LA SUSCEPTIBILITAT AL TRACTAMENT AMB 20 mg/Kg STZ.	62
2.2.1. Seguiment de la glucèmia.	62
2.2.2. Anàlisi del percentatge de ratolins que desenvolupen diabetis després del tractament amb 20 mg/Kg de STZ.	64
2.2.3. Anàlisi histològica del pàncrees dels ratolins.	64
3. ESTUDI DE LA SENSIBILITAT DELS ANIMALS TRANSGÈNICS RIP/IGF-II A DESENVOLUPAR DIABETIS EN UN FONS GENÈTIC MÉS SUSCEPTIBLE.	67
3.1. OBTENCIÓ D'ANIMALS DOBLE TRANSGÈNICS QUE EXPRESSEN ELS GENS QUIMÈRICS RIP/IGF-II I RIP/hIFN β EN LES CÈL·LULES β PANCREÀTIQUES.	67
3.1.1. Comprovació de la co-expressió dels dos gens quimèrics.	68

3.2. ANÀLISI METABÒLICA DELS RATOLINS DOBLE TRANSGÈNICS IFN β /IGF-II.	69
3.2.1. Test de tolerància a la glucosa.	69
3.2.2. Seguiment de la glucèmia en alimentació.	70
3.2.3. Anàlisi del percentatge d'individus que desenvolupen diabetis.	71
3.2.4. Determinació dels nivells d'insulina i hIFN β circulant.	72
3.3. ANÀLISI DEL PÀNCREES DELS RATOLINS DOBLE TRANSGÈNICS IFN β /IGF-II.	74
3.3.1. Anàlisi histològica dels pàncrees dels ratolins doble transgènics.	74
3.3.2. Determinació de la massa de cèl·lula β dels ratolins doble transgènics.	76
3.3.3. Determinació del grau d'insulitis present en els illots.	77
3.3.4. Anàlisi dels nivells d'expressió de MHC de classe I i II en illots dels ratolins doble transgènics IFN β /IGF-II.	78
V. DISCUSSIÓ	80-94
VI. CONCLUSIONS	95
VII. MATERIALS I MÈTODES	96-112
1. MATERIALS.	96
1.1. ANIMALS.	96
1.2. REACTIUS.	96
1.3. SONDES.	96
1.4. ANTICOSSOS.	97
2. MÈTODES.	98
2.1. DETECCIÓ DELS ANIMALS TRANSGÈNICS.	98
2.1.1. Obtenció de DNA genòmic.	98
2.1.2. Anàlisi del DNA per Southern blot.	99
2.1.2.1. Digestió i electroforesi del DNA genòmic.	99
2.1.2.2. Transferència del DNA a la membrana.	99
2.1.2.3. Marcatge radioactiu de les sondes de DNA.	100
2.1.2.4. Hibridació de la membrana.	100
2.1.2.5. Rentats de la membrana i revelat.	100
2.1.3. Anàlisi del DNA per PCR.	101
2.2. EXTRACCIÓ D'ILLOTS PANCREÀTICS.	102
2.3. EXTRACCIÓ DE RNA.	103
2.3.1. Extracció de RNA d'illots pancreàtics.	103
2.3.2. Extracció de RNA de pàncrees total.	103
2.4. PCR A TEMPS REAL.	103
2.5. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE GENS MITJANÇANT MICROARRAYS DE DNA.	105
2.6. EXTRACCIÓ I ANÀLISI DE PROTEÏNES.	105
2.6.1. Extracció de proteïnes d'illots pancreàtics.	105
2.6.2. Extracció de proteïnes de pàncrees total.	106

2.6.3. Determinació de la concentració de proteïnes.	106
2.6.4. Anàlisi de l'expressió de proteïnes mitjançant Western blot.	107
2.6.4.1. Electroforèsi en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE).	107
2.6.4.2. Transferència de proteïnes a membranes i immunodetecció.	107
2.7. DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES SÈRICS.	108
2.7.1. Glucosa.	108
2.7.2. Insulina.	108
2.7.3. INF- β .	108
2.8. TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA.	109
2.9. SECRECIÓ D'INSULINA <i>IN VIVO</i> .	109
2.10. INDUCCIÓ DE LA DIABETES EXPERIMENTAL MITJANÇANT STZ.	110
2.11. ANÀLISI IMMUNOHISTOQUÍMIC DEL PÀNCREES.	110
2.11.1. Determinació de la massa de cèl·lula β .	110
2.11.2. Detecció d'apoptosi en la cèl·lula β .	111
2.11.3. Detecció de replicació en la cèl·lula β .	111
2.11.4. Anàlisi del percentatge d'infiltració.	112
2.12. ANÁLISIS ESTADÍSTIQUES.	112
VIII. BIBLIOGRAFIA	113-128

I. PRESENTACIÓ

La diabetis mellitus tipus 1 i la tipus 2 són malalties metabòliques amb etiologies molt diferents, que afecten col·lectivament a un 10% de la població mundial. En ambdós casos l'alteració metabòlica més important és la hiperglucèmia, resultant de la deficiència absoluta (tipus 1) o bé relativa (tipus 2) d'insulina. Concretament, la diabetis tipus 2 es caracteritza per una resistència a la insulina, per part dels teixits perifèrics, acompanyada d'un defecte en la secreció de la hormona, per part de les cèl·lules β pancreàtiques. La diabetis oberta, però, només es dona quan les cèl·lules β no són capaces de continuar compensant la resistència a la insulina. Així doncs, les alteracions en la funcionalitat de les cèl·lules β serien un component clau en el desenvolupament de la diabetis tipus 2, i no una simple conseqüència de la patologia. Per tant, per tal d'investigar els mecanismes i les causes que condueixen a la diabetis oberta, resulta d'enorme interès l'estudi de les cèl·lules β en els estadis inicials d'aquest procés. Així, l'objectiu d'aquest treball ha estat estudiar el paper de les cèl·lules β en el desenvolupament del procés diabètic.

Ratolins transgènics que sobreexpressen el factor de creixement IGF-II específicament a les cèl·lules β pancreàtiques (ratolins RIP/IGF-II) presenten una sèrie d'alteracions metabòliques característiques d'un estat pre-diabètic. D'altra banda, s'han descrit diverses alteracions gèniques que confereixen susceptibilitat a desenvolupar diabetis, com són el *locus* *IDDM2* i *SNPs* en el gen *IGF2BP2*, que podrien estar associades a variacions en els nivells d'expressió d'IGF-II. Aquests animals transgènics podrien ser doncs un bon model per estudiar les cèl·lules β en les fases inicials del procés diabètic i la possible implicació d'IGF-II en el desenvolupament d'aquesta patologia.

En aquest treball es van analitzar tant funcional com estructuralment les cèl·lules β dels ratolins RIP/IGF-II. Es va observar que les cèl·lules β d'aquests ratolins transgènics presentaven una disminució en la secreció d'insulina en resposta a glucosa. Aquesta disminució podria venir donada per les alteracions funcionals presents en aquestes cèl·lules, així com a les alteracions estructurals dels illots. S'observava una disminució en l'expressió de Glut2 i insulina, probablement deguda a una reducció dels factors de transcripció que regulen la seva expressió. A nivell estructural els illots dels ratolins transgènics, presentaven un increment en l'expressió de proteïnes importants de la matriu extracel·lular, i en canvi s'observava una disminució de molècules implicades en les adhesions intracel·lulars. A més a més, els illots dels ratolins transgènics presentaven hiperexpressió de molècules involucrades en la resposta immunitària, com els MHCs de classe I i II, tot i no presentar infiltració limfocitària. Així doncs, l'expressió d'IGF-II en les cèl·lules β dels ratolins transgènics provocava alteracions funcionals en els illots similars a les descrites en models animals o en pacients diabètics.

L'evolució del procés diabètic és un procés llarg i varia molt entre individus. En l'evolució d'aquest procés hi intervindrien tant les alteracions presents en les cèl·lules β de cada individu, com la influència de factors externs. En aquest treball es va estudiar si les alteracions descrites en les cèl·lules β dels ratolins RIP/IGF-II, podrien predisposar-los a desenvolupar diabetis oberta en front a un estímul que actués com a factor accelerador. Així doncs, vam determinar la susceptibilitat dels ratolins RIP/IGF-II en front dos estímuls diferents: a) el tractament amb molt baixes dosis d'estreptozotocina (STZ), que simularia un efecte tòxic, específic per les cèl·lules β ; i b) un procés autoimmune, que seria un procés més crònic i comú en la patologia diabètica.

Després del tractament amb STZ, es va observar que, efectivament, aquest ratolins transgènics resultaven ser més sensibles a dosis molt baixes, considerades no diabetogèniques pels ratolins control. En segon lloc, per tal d'induir la infiltració limfocitària als ratolins RIP/IGF-II, aquests es creuaren amb ratolins transgènics RIP/hIFN β . L'expressió d'IFN β en cèl·lules β resulta en una important infiltració dels illots dels ratolins transgènics. D'aquest creuament s'obtingueren ratolins doble transgènics IFN β /IGF-II, un 75% dels quals desenvoluparen diabetis espontània durant els dos primers mesos de vida. Demostrant així que les alteracions pre-diabètiques descrites en les cèl·lules β dels ratolins IGF-II, incrementaven la susceptibilitat a desenvolupar diabetis oberta en presència d'un factor accelerador.

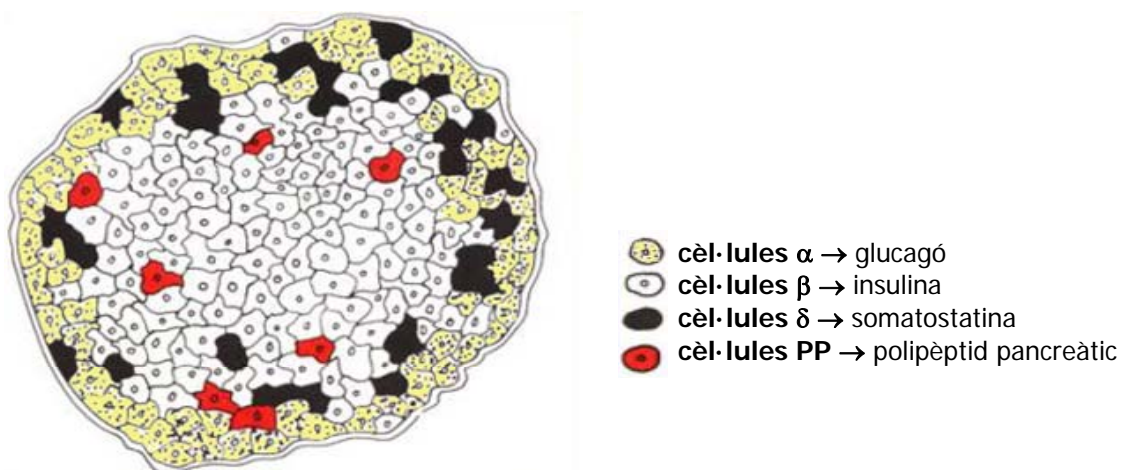
Així doncs, els resultats d'aquest treball indiquen que alteracions en la funcionalitat de les cèl·lules β pancreàtiques serien necessàries per incrementar la susceptibilitat a certs factors ambientals que desencadenen la diabetis mellitus. A més, el nostre estudi suggereix que l'increment d'IGF-II en cèl·lules β podria ser un factor clau en l'inici del procés diabètic.

II. INTRODUCCIÓ

1. LA CÈL·LULA β PRODUCTORA D'INSULINA.

Les cèl·lules β són les responsables del control de la glucèmia de l'organisme mitjançant la biosíntesi i secreció d'insulina. Es troben localitzades en els *illots de Langerhans* del pàncrees.

Els illots de Langerhans constitueixen la fracció endocrina del pàncrees i representen només un 1-2% de la massa total del pàncrees adult. Estan envoltats per una càpsula de teixit connectiu característica que els aïlla del teixit exocrí i els ajuda a mantenir la seva integritat estructural. Els illots es localitzen de forma dispersa al llarg de tot el pàncrees exocrí, tot i que, degut al seu origen embrionari, es situen relativament pròxims als ductes pancreàtics. Aproximadament, hi ha un milió d'illots repartits en els pàncrees humans, entre 1000 i 2000 en les rates i uns 500 en els pàncrees dels ratolins. Cada illot conté aproximadament unes 2000 cèl·lules que constitueixen un mosaic de diversos tipus cel·lulars que secreten diferents hormones. Es tracta d'un òrgan endocrí amb funcions complexes, moltes de les quals encara són poc clares. Els illots estan constituïts per quatre tipus cel·lulars diferents: les cèl·lules α , β , δ i PP, cadascuna de les quals secreta una hormona diferent i presenta una distribució característica dins de l'illot (Esquema 1). Les cèl·lules β , productores d'insulina, són les més abundants (60-80%) i es situen al centre de l'illot; les cèl·lules α , productores de glucagó, suposen aproximadament el 15-20% de la massa total de l'illot i estan situades a la perifèria; i, distribuïdes entre les cèl·lules α i les β , es troben les cèl·lules δ (5%) i les cèl·lules PP (1-2%), que secreten somatostatina i polipèptid pancreàtic, respectivament. A més de les cèl·lules secretores endocrines, els illots estan ben innervats i contenen abundants capil·lars que permeten que les hormones produïdes siguin alliberades directament a la sang i, a través de la vena porta, siguin transportades cap al fetge i a la resta de l'organisme. (Pickup & Williams, 2003).



Esquema 1. Distribució dels diferents tipus cel·lulars en els *illots de Langerhans*.

1.1. FACTORS QUE CARACTERITZEN LES CÈL·LULES β .

La cèl·lula β s'origina directament des d'una cèl·lula epitelial precursora, la qual expressa marcadors específics que la faran diferenciar fins a cèl·lula β madura. En els últims anys, l'estudi dels factors de transcripció que s'expressen en les cèl·lules β ha portat a concloure que, aquestes proteïnes, poden tenir un doble paper per a l'organisme: 1) durant l'embriogènesi, on determinarien la diferenciació de les cèl·lules epitelials a endocrines i d'aquestes fins a cèl·lules β madures; i 2) en l'adult, mantenint el fenotip de les cèl·lules β madures i assegurant l'expressió específica de teixit de les hormones que produeixen aquestes cèl·lules. Per tant, els mateixos factors de transcripció que regulen la transcripció dels gens i el bon funcionament de les cèl·lules β d'un individu adult, estan també implicats en la diferenciació d'aquestes cèl·lules durant el desenvolupament embrionari del pàncrees (Sander & German, 1997; Yamaoka, 1999; Edlund, 2001). Alguns d'aquests factors/marcadors de les cèl·lules β són per exemple Pdx1, Beta2/NeuroD1, MafA, HNF1 α , HNF3 β , HNF4 α , Nkx6.1 i Pax4 entre altres:

Pdx1 (Pancreatic duodenal homeobox-1). Factor identificat en diferents laboratoris i per tant rep diversos noms: Ipf-1, Stf-1 i Idx-1. Aquest és un dels principals factors de transcripció, tant durant el desenvolupament embrionari del pàncrees, com per la diferenciació de les cèl·lules endocrines progenitores a cèl·lules β . Durant l'embriogènesi apareix per primer cop a dia e8.5 en el lòbul pancreàtic primigeni. En l'adult s'expressa en illots pancreàtics (cèl·lules β i δ), en ductes, duodè i estómac. A les cèl·lules β actua com a factor de transcripció dels gens de la insulina (Ohlsson, 1991), el transportador de glucosa GLUT2 (Waeber, 1996), l'IAPP (*islet amyloid polypeptide*) (Watada, 1996a), la glucoquinasa (Watada, 1996b) i el factor de transcripció Nkx6.1 (Shih, 2002). En les cèl·lules β diferenciades Pdx1 regula l'expressió d'insulina en resposta a glucosa. La funció de Pdx1 en resposta a glucosa ve regulada tant a nivell de fosforil·lació de la proteïna, com de la seva translocació al nucli (Habener, 2005). D'altra banda l'expressió del gen de Pdx1 està regulada per altres factors de transcripció, com per exemple: NeuroD1, HNF1 α i HNF3 β (Ben-Shushan, 2001). La inactivació del gen de Pdx1 en ratolins dóna lloc a una agènesis del pàncrees. Els ratolins homozigots per aquesta inactivació són viables, però moren als pocs dies de vida (Jonsson, 1994). En humans, s'han descrit també varies mutacions en el gen de Pdx1 que donen lloc a un tipus de diabetis classificada com a MODY4; en funció de la mutació, es dóna una marcada intolerància a la glucosa o una severa diabetis no dependent d'insulina (Stoffers, 1997). Així doncs, Pdx1 és un regulador clau per la supervivència, el manteniment de la massa i les funcions de les cèl·lules β madures (Ackermann, 2007).

Beta2/NeuroD1. El *β -cell E-box trans-activator 2* (BETA2), o també anomenat *Neurogenic differentiation 1* (NeuroD), és un factor de transcripció de tipus basic *helix-loop-helix*, clau tant per la diferenciació de les diferents cèl·lules endocrines, com per la regulació del gen de la insulina en les cèl·lules β pancreàtiques (Naya, 1995). En el desenvolupament embrionari s'expressa a partir del dia e9,5. Els ratolins homozigots per la manca d'aquest factor sobreviuen al naixement, però moren d'hiperglucèmia entre 3 i 5 dies després del part per manca de cèl·lules α , β o δ en els seus illots (Naya, 1997). En humans, certes mutacions en el gen d'aquest factor de transcripció s'han associat al desenvolupament d'un tipus de diabetis, de transmissió autosòmica dominant, anomenada MODY6 (Malecki, 1999).

MafA. Factor de transcripció identificat recentment com a important regulador de la funció de la cèl·lula β pancreàtica i com a marcador específic d'aquest tipus cel·lular. MafA és un dels factors de transcripció que regula l'expressió d'insulina per interacció directa amb el seu promotor (Kataoka, 2002; Olbrot, 2002; Matsuoka, 2004). Els ratolins genosuprimits per aquest gen presenten un desenvolupament pancreàtic normal però presenten alteració en la morfologia dels illots, disminució de l'expressió d'insulina, Pdx1, NeuroD1 i Glut2, intolerància a la glucosa deguda a una disminució en la secreció d'insulina, i acaben desenvolupant diabetis (Zhang, 2005).

HNF1 α (*Hepatocyte nuclear factor 1 α*). Factor de transcripció expressat en el pàncrees durant el desenvolupament embrionari a partir del dia e13.5 i d'expressió restringida a cèl·lula β en el pàncrees adult. Implicat en la regulació de l'expressió gènica de Pdx1, insulina, Glut2 i de diversos factors de transcripció com són HNF4 α , HNF3 β o Pax4, entre d'altres (Wang, 1998; Servitja, 2004). Es creu que HNF1 α pot tenir un paper important en la funció de la cèl·lula β i de la homeòstasi de la glucosa. Els animals genosuprimits per Hnf1 α presenten una disminució en la secreció d'insulina estimulada per glucosa i desenvolupen diabetis tipus 2 un parell setmanes després del naixement (Dukes, 1998; Pontoglio, 1998; Lee, 1998). Certes mutacions del gen d'HNF1 α , en humans, donen lloc a l'anomenada MODY3, un síndrome metabòlic caracteritzat per una alteració en la secreció d'insulina i desenvolupament de diabetis en pacients joves (Yamagata, 1996).

HNF3 β (*Hepatocyte nuclear factor 3 β*). També anomenat forkhead box A2, FoxA2. Com la resta de HNFs s'expressa en el pàncrees tant a nivell fetal com en l'animal adult. Està descrit que HNF3 β indueix l'expressió de Pdx1 (Wu, 1997; Lee, 2002), i que regula també la transcripció d'importants factors com Ngn3, HNF4 α , HNF1 α , Nkx6.1 (Wilson, 2003), i de les subunitats Kir6.2 i SUR1, que constitueixen els canals de potassi dependents d'ATP de les cèl·lules β (Sund, 2001; Lantz, 2004). La genosupressió de HNF3 β és letal a nivell embrionari, i animals genosuprimits per

HNF3 β específicament a cèl·lula β moren d'hipoglucèmia pocs dies després de néixer (Sund, 2001; Wilson, 2003; Cerf, 2005).

HNF4 α (*Hepatocyte nuclear factor 4 α*). Factor de transcripció important també pel desenvolupament dels illots. Implicat en la regulació de la transcripció de factors com HNF1 α i Pax4, i de certs enzims glicolítics. Com en el cas d'altres factors de transcripció de la mateixa família, la seva genosupressió és letal a nivell embrionari (Wilson, 2003). En humans, certes alteracions en aquest factor donen lloc a l'alteració de la funcionalitat de les cèl·lules β i al desenvolupament d'una forma de diabetis, no dependent d'insulina, anomenada MODY1 (Yamagata, 1996).

Pax6. Factor de transcripció implicat també en el desenvolupament dels illots, expressat a partir del dia embrionari e9. En adults s'expressa a diferents cèl·lules dels illots i intervé en la regulació de la transcripció dels gens de la insulina, glucagó i somatostatina (Wilson, 2003). Els animals genosuprimits pel gen Pax6 en homozigosi moren als pocs minuts del naixement. En aquests animals no s'hi dona la formació dels illots, sinó que es troben cèl·lules endocrines aïllades en l'exocrí. La desorganització en aquests model genosuprimit s'ha proposat que podria estar relacionada amb una connexió entre Pax6 i molècules d'adhesió cel·lular com per exemple N-CAM, de les quals en regularia la seva transcripció (Holst, 1997; Habener, 2005).

Nkx2.2 i *Nkx6.1*. Ambdós formen part de la família de factors de transcripció NK2 i són importants reguladors de la diferenciació de les cèl·lules endocrines del pàncrees. Nkx2.2 s'expressa a partir de dia e9.5 a tot el pàncrees embrionari i en adults la seva expressió es restringeix a les cèl·lules α , β i PP dels illots. El seu paper sembla ser important en la diferenciació final de les cèl·lules β i per l'expressió tant d'insulina com de Glut2, glucoquinasa i Nkx6.1. L'expressió d'aquest darrer s'inicia a dia e10.5 i es dona de forma específica a les cèl·lules β adultes. Nkx6.1 podria ser també un transactivador del gen de la insulina. La inactivació tant del gen Nkx2.2 com del Nkx6.1 en ratolins provoca la mort d'aquestes poques hores després del naixement degut a una diabetis severa (Sussel, 1998; Jensen, 1996; Wilson, 2003; Cerf, 2005).

La regulació de l'expressió de tots aquests factors és molt important, tant pel desenvolupament, com pel manteniment de les funcions pròpies de les cèl·lules β pancreàtiques. Variacions en els nivells d'expressió, o activitat, d'algun d'aquests factors poden donar lloc a alteracions importants del funcionament de les cèl·lules β pancreàtiques i al desenvolupament de diferents tipus de diabetis (Bell, 2001).

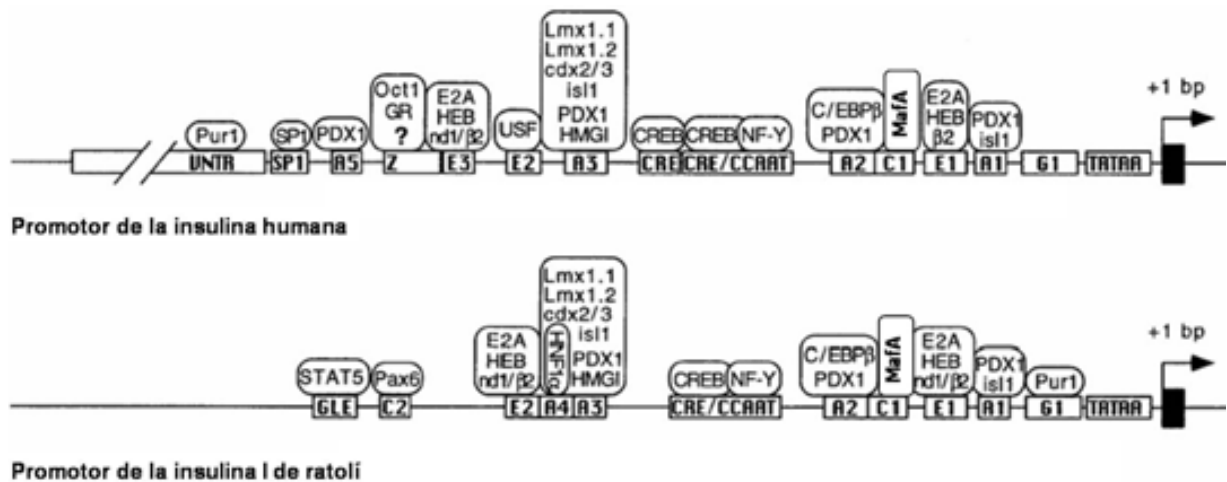
1.2. REGULACIÓ DE L'EXPRESSIONI DEL GEN DE LA INSULINA.

El gen de la insulina s'expressa, en un adult, de forma específica a les cèl·lules β dels *illots de Langerhans*, tot i que també s'han detectat nivells d'expressió molt baixos a cervell, retina i timus. La insulina s'expressa de forma molt forta, de l'ordre aproximat d'unes 100.000 molècules de RNAm d'insulina a partir de l'estimulació per glucosa, el que representa 2 ordres de magnitud superior que els nivells d'expressió del RNAm de β -actina (Poitout,2004).

La seqüència del gen de la insulina està altament conservat durant l'evolució, així, la insulina dels vertebrats més primitius i la de l'home difereixen únicament en unes poques bases. En la majoria d'espècies es presenta com un gen d'una sola còpia. En el cas dels humans, per exemple es localitza en el cromosoma 11, entre els gens de la tirosina hidroxilasa i el del factor de creixement similar a la insulina-II (IGF-II). Els rosegadors en canvi tenen dues còpies del gen de la insulina: la insulina 2 (Ins2), que seria la homòloga a la insulina humana i es localitza al cromosoma 7, i la insulina 1 (Ins1), que sembla ser el resultat d'una duplicació gènica del gen original d'insulina i es localitza al cromosoma 19 (Wentworth, 1986). Tot i codificar per la mateixa proteïna, aquests dos gens tenen diferents patrons d'expressió: el gen original, Ins2 es detecta a partir del dia embrionari e8.5, i s'expressa a nivell de pàncrees, fetge i timus; en canvi el gen Ins1 inicia la seva expressió a dia embrionari e9.5 i en adults només s'expressa a nivell de pàncrees i de retina (Deltour, 1993; Budd, 1993).

La regulació metabòlica i l'especificitat d'expressió de la insulina estan controlades per múltiples seqüències reguladores de DNA que uneixen factors de transcripció i que majoritàriament estan localitzades en el seu promotor. De les múltiples regions del promotor importants per l'activació i control del gen de la insulina en destaquen 4 d'especial rellevància: les regions C2, A3, C1 i E1. El factor de transcripció Pdx1 s'uneix a les regions riques en AT de la regió promotora A3 i activa la transcripció (Petersen,1994). Pdx1 també interacciona amb el factor de transcripció Beta2/NeuroD1, el qual s'uneix a la regió E1 del promotor (Shieh,1991; Peyton, 1994). Aquestes dues regions (A3, E1) juntament amb la regió C1, són els elements més important de regulació de l'expressió en resposta a glucosa. L'activador de la regió C1 ha estat recentment identificat com el factor de transcripció MafA (Olbro,2002), i en la regió C2 s'hi uneixen els factors PAX4 i PAX6 (Sander,1997). El promotor de la insulina també conté elements CRE de resposta a AMPc. El paper dels HNFs en la transcripció de la insulina encara no és del tot clar (Poitout, 2004). Tots aquests factors interaccionen entre ells i amb diferents cofactors, que són a la vegada regulats per múltiples paràmetres. Un dels reguladors més important de tots aquests factors és la pròpia glucosa.

Donat que la majoria factors de transcripció tenen una activitat sinèrgica en l'activació de la transcripció del gen de la insulina, fa pensar que l'especificitat de teixit ve determinada per la cooperació de diferents proteïnes reguladores que formarien un gran complex transcripcional (Esquema 2).



Esquema 2. Esquema de la regió promotora/reguladora del gen de la insulina humana i de la insulina I de ratolí. Seqüències reguladores i factors de transcripció més importants (adaptació d'Ohneda, 2000).

1.3. REGULACIÓ DE LA BIOSÍNTESI D'INSULINA.

El regulador més important de la síntesi de la insulina és també la glucosa, la qual actua bàsicament a través de 3 mecanismes: 1) mitjançant un increment selectiu de la transcripció del gen de la insulina, alterant l'expressió i la localització intracel·lular dels diferents factors de transcripció comentats en l'apartat anterior; 2) una estabilització selectiva dels RNA missatgers (RNAm) de la insulina i 3) una estimulació de la traducció dels RNAm de la insulina de forma ràpida i selectiva (Steiner, 1989). No obstant, no són massa clars els missatgers intracel·lulars implicats en l'efecte de la glucosa en la síntesi d'insulina. En canvi, sí que es coneix que la glucosa ha de ser metabolitzada dins la cèl·lula β per tal que pugui produir-se la resposta.

La síntesi de la insulina és un procés complex que involucra la formació de dues molècules precursors, la preproinsulina i la proinsulina. Un cop transcrita la preproinsulina passa del ribosoma al reticle endoplasmàtic on és degradada per proteases específiques, d'aquesta manera es transforma a proinsulina. Aquesta és convertida a insulina dins de grànuls que provenen de l'aparell de Golgi. Dins d'aquests grànuls les proteases, activades per un pH àcid, trenquen el pèptid de connexió anomenat *pèptid C*, que uneix les cadenes A i B de la insulina, alliberant-se la insulina madura i amb activitat biològica. Aquesta insulina madura està constituïda per 51 aminoàcids repartits en les dues cadenes polipeptídiques A (21aa) i B (30aa). Les dues cadenes s'uneixen per dos ponts disulfur intercatenaris

1.4. REGULACIÓ DE LA SECRECIÓ D'INSULINA.

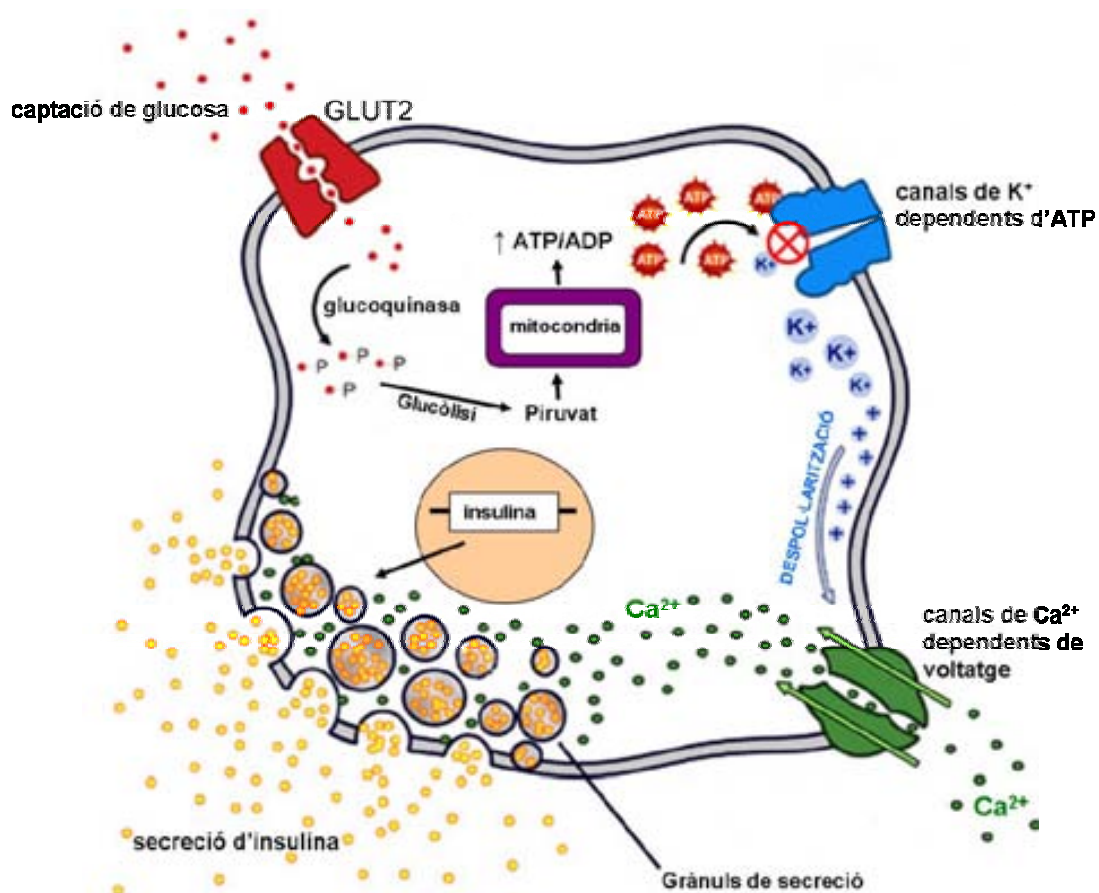
L'estímul més important per la secreció d'insulina és també la glucosa. La cèl·lula β es comporta com un sensor, sent sensible a petites variacions de la concentració de glucosa en sang. A part de la glucosa, existeixen però altres factors reguladors que poden ser nutrients (manosa i aminoàcids, com la leucina i l'arginina), neurotransmissors (acetilcolina i *Vasoactive Intestinal Peptide* (VIP)) i hormones (glucagó, *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1)).

La resposta de la cèl·lula β als reguladors fisiològics és molt ràpida, la secreció es produeix pocs segons després de la seva exposició a l'estímul i s'anul·la també molt ràpidament quan l'estímul desapareix o després de la seva exposició a un estímul inhibidor. El fet que la cèl·lula β pugui respondre a aquesta àmplia varietat de factors implica que aquesta cèl·lula ha d'estar equipada amb els mecanismes sensors i efectors específics per a cadascun dels sistemes reguladors. A més a més, hi ha d'haver un gran acoblament entre els sistemes sensors i els efectors, responsables de la mobilització i exocitosi dels grànuls d'insulina. Tot aquest procés involucra diverses senyals intracel·lulars que fins al moment no són gens clares. El que sí que es coneix és que el calci (Ca^{2+}) té un paper important com a senyal primari per l'activació del procés de secreció, mentre que l'AMPc el tindria en la modulació de la magnitud d'aquesta resposta. Així, els diversos efectors (nutrients, neurotransmissors i hormones) actuarien provocant variacions en la concentració intracel·lular de calci i AMPc que farien de missatgers dins de la cèl·lula β .

En el cas de la glucosa, aquesta entra dins de la cèl·lula β per difusió facilitada a través del transportador de glucosa GLUT2, que presenta una afinitat molt elevada per la glucosa. Un cop a dins, és fosforil·lada en posició 6, transformant-se en glucosa-6-fosfat per l'acció de l'enzim glucoquinasa, enzim que mostra també una elevada K_m per la glucosa. Tant el transportador GLUT2 com la glucoquinasa actuen com a sensors de la glucosa, modulant la secreció d'insulina enfront els canvis de concentració de glucosa extracel·lulars. De fet, la glucoquinasa controlaria la ratio d'entrada de glucosa a la via glucolítica i el seu subseqüent metabolisme (Bell, 2001) (Esquema 3).

És el metabolisme de la glucosa dins la cèl·lula β el que genera la senyal perquè es produeixi la secreció d'insulina. Aquest senyal és l'ATP, generat tant en la glucòlisi com en el cicle de Krebs. L'augment d'ATP intracel·lular provoca el tancament dels canals de potassi (K^+) dependents d'ATP i, com a conseqüència, es produeix una despol·larització de la membrana que indueix la obertura dels canals de calci (Ca^{2+}) dependents de voltatge. Aquesta obertura dona lloc a una entrada i un augment important dels nivells de Ca^{2+} a l'interior de la cèl·lula. L'acció de

diversos secretagogs estimulen la fosfolipasa C (PLC) que actua sobre el fosfatidil inositol (PIP₂) generant inositol trifosfat (IP₃) i diacilglicerol (DAG). L'IP₃ permet l'alliberació del Ca²⁺ emmagatzemat en el reticle endoplasmàtic i activa la proteïna quinasa depenent de calmodulina. Per altra banda, el DAG activa la proteïna quinasa C (PKC), la qual permetrà la fosforil·lació de diverses proteïnes intracel·lulars que regularan l'exocitosi dels grànuls d'insulina. Tot aquest conjunt de senyals provoca la fusió dels grànuls de secreció a la membrana plasmàtica i alliberació de la insulina a la circulació, com la síntesi de nova insulina (Pickup & Williams, 2003) (Esquema 3).



Esquema 3. Esquema de la secreció d'insulina en resposta a glucosa (adaptació del *Beta cell biology consortium*).

L'increment ràpid dels nivells de glucosa en sang comporta una resposta bifàsica en la secreció d'insulina. La primera fase es dona als pocs minuts (3 -5 minuts) i correspon a l'exocitosi de la insulina acumulada en els grànuls de secreció dins de les cèl·lules β , tal i com s'ha descrit anteriorment. La segona fase d'alliberament d'insulina, més sostinguda, persistent durant tota la hiperglucèmia, és deguda a la síntesi i posterior secreció d'insulina sintetitzada *de novo* (Kahn, 2001). La primera fase té una important funció fisiològica d'eliminació ràpida de glucosa circulant (Luzi & DeFronzo, 1989), i s'ha observat una manca d'aquest primer pic de secreció en pacients amb diabetis tipus 2 (Bruce, 1988).

1.5. ACCIÓ DE LA INSULINA.

La principal funció de la insulina és mantenir la homeòstasi de la glucosa, mitjançant l'estimulació de la utilització de la glucosa en els teixits perifèrics (múscul i teixit adipós), la inhibició de la producció de glucosa hepàtica i l'activació de la síntesi de glucogen en el fetge. Aquesta funció metabòlica la realitza en unir-se a receptors específics presents en tots els teixits diana de l'hormona (Chetham, 1995; Saltiel, 2001). La unió de la insulina amb els seus receptors específics genera segons missatgers intracel·lulars que iniciaran una cascada de senyals de fosforil·lacions i defosforil·lacions que resulta en una estimulació de la captació i metabolisme de la glucosa, transcripció de gens, síntesi proteica, etc.

El receptor de la insulina (IR) pertany a una subfamília de receptors tirosina quinasa, que inclou també al receptor del factor de creixement similar a la insulina-I (IGF-IR). Aquests receptors són tetramèrics, contenen dues subunitats reguladores α i dues subunitats catalítiques β . Existeixen dues isoformes del receptor de la insulina (IR-A i IR-B) que són el resultat d'un *splicing* alternatiu de l'exó 11 del gen, un exó de 36pb (Seino, 1989). En l'estructura madura del receptor els 12 aa provinents d'aquests 36pb es localitzen a l'extrem C-terminal de la subunitat α . En funció de si es dóna o no aquest *splicing* s'obté una isoforma amb l'exó (11+) anomenada IR-B o una isoforma sense aquest exó (11-) anomenada IR-A. Aquest *splicing* alternatiu ve regulat tant a nivell de desenvolupament com a nivell de teixit, però els mecanismes precisos i els factors implicats en el procés encara es desconeixen (Moller, 1989). Tot i la petita diferència de només 12 aa a nivell estructural, les dues isoformes del IR presenten certes propietats úniques. La isoforma IR-A s'expressa sobretot a nivell de desenvolupament embrionari, i es creu que podria tractar-se d'una isoforma principalment fetal, mentre que la isoforma IR-B seria la predominant en els teixits adults i cèl·lules diferenciades (Denley, 2003).

La unió de la insulina a les subunitats α del receptor indueix un canvi conformacional a les subunitats β que fomenta la seva activació i autofosforil·lació, degut a un increment en l'activitat quinasa d'aquestes darreres subunitats (Patti, 1998). La transducció del senyal implica la fosforil·lació de tirosines de tota una sèrie de proteïnes intracel·lulars (substrats) que s'associen a les subunitats β del receptor. Almenys es coneixen 9 substrats intracel·lulars dels receptors de la insulina i d'IGF-I. Quatre d'aquests substrats pertanyen a una família de proteïnes anomenada substrats del receptor d'insulina (IRS) (White, 1998). Tot i l'elevada homologia entre les diferents proteïnes IRS, diversos estudis suggereixen que tenen funcions complementaries més que no pas redundants en la senyalització de la insulina/IGF-I. L'IRS-1 regularia el creixement cel·lular i està involucrat en les accions de la insulina a nivell de múscul i teixit adipós. Ratolins deficientes en homozigosi per IRS-1 (*Irs1^{-/-}*) mostren un retard en el creixement tant pre- com postnatal, així

com una marcada resistència a la insulina en els teixits perifèrics i una alteració en la tolerància a la glucosa (Tamemoto, 1994; Araki, 1994). L'IRS-2, en canvi, s'ha relacionat amb les accions de la insulina principalment a fetge i cervell, i es creu que té un paper important en el desenvolupament de les cèl·lules β (Rother, 1998; Withers, 1998). Ratolins deficients per IRS-2 mostren resistència a la insulina en els teixits perifèrics i fetge, però el seu retard en el creixement només afecta a determinats teixits, incloent certes regions del cervell, illots pancreàtics i retina. En els ratolins deficients homozigots per IRS-2 (*Irs2^{-/-}*), l'efecte multifactorial de la resistència a la insulina i la disminució en la massa de cèl·lula β provoca el desenvolupament de diabetis tipus 2 (Kido, 2000; Withers, 1998). Les vies de senyalització relacionades amb l'IRS-3 i IRS-4 són encara molt desconegudes. Ratolins deficients per IRS-3 i IRS-4 tenen un creixement i un metabolisme aparentment normals (Fantin, 2000).

L'activació del receptor iniciada amb la unió de la insulina dóna lloc a la fosforil·lació de residus de tirosines de les proteïnes IRS. Aquesta fosforil·lació promou la seva unió a la phosphatidylinositol-3-quinasa (PI 3-kinase), Grb2/SOS i SHP2. El complex Grb2/SOS media l'activació de la cascada de quinases $\text{ras} \rightarrow \text{raf} \rightarrow \text{MEK} \rightarrow \text{MAPK}$. La proteïna SHP2 actua inhibint la cascada de senyalització de IRS mitjançant la defosforil·lació directa d'aquestes proteïnes i transmetent altres senyals que activaran també la via de senyalització de les MAP quinases. L'activació de la PI3-quinasa resulta en la generació de varis fosfolípids com són el fosfatidilinositol-3,4-bisfosfat i el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat. Aquests a la vegada activen diverses quinases com mTOR, PKC o la PDK, que activaran altres quinases, continuant així amb la cascada de senyalització intracel·lular. Una de les quinases activades a través de la PDK és la PKB/Akt, la qual contribueix directament en la regulació de varies respostes biològiques com poden ser: promoure el transport de glucosa, la síntesi de proteïnes, la síntesi de glucogen, la proliferació cel·lular i la supervivència de diferents tipus cel·lulars (Pickup & Williams, 2003).

Qualsevol alteració que afecti la funcionalitat de les cèl·lules β pancreàtiques o el mecanisme d'acció de la insulina pot donar lloc a greus problemes metabòlics, i al desenvolupament de diabetis mellitus.

2. LA DIABETIS MELLITUS.

La diabetis mellitus és un conjunt de malalties metabòlics amb etiologies molt diferents que afecten col·lectivament a un 10% de la població mundial. Els canvis en l'ambient i en els costums i estil de vida han incrementat la incidència d'aquestes patologies de forma alarmant en les últimes dècades, i es creu que en els pròxim 10-20 anys podrien arribar a proporcions epidèmiques. Així doncs, resulta d'enorme interès l'estudi dels factors i mecanismes que indueixen la seva aparició. Aquest conjunt de síndromes, es caracteritzen principalment per una hiperglucèmia resultant dels defectes en la secreció d'insulina i/o en la seva acció. Es classifiquen principalment en 2 categories: diabetis tipus 1, causada per una deficiència absoluta d'insulina, afecta aproximadament a un 10% dels pacients diabètics i s'inicia sobretot en adolescents i infants; i diabetis tipus 2, causada per la combinació d'una resistència a l'acció de la insulina i una inadequada secreció d'aquesta hormona; correspondria al 90% dels pacients diabètics i s'inicia en edats més avançades (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997).

3. LA DIABETIS MELLITUS NO DEPENDENT D'INSULINA (TIPUS 2).

La diabetis tipus 2, a diferència de la tipus 1, no es caracteritza per una absència d'insulina, si més no en els estadis inicials, sinó per una disminució de la resposta del fetge i dels teixits perifèrics a la hormona (resistència a la insulina), acompanyada d'un defecte en la secreció d'insulina. Aquesta resistència condueix a una disminució de la utilització de la glucosa en múscul i teixit adipós, i a un augment de la producció hepàtica de glucosa. Aquestes alteracions, conjuntament amb els defectes en la secreció d'insulina, donen lloc a hiperglucèmia, l'alteració metabòlica més important (Lowe, 1998).

Les causes que indueixen a desenvolupar diabetis tipus 2 encara són desconegudes. Factors genètics, tot i que no es coneixen bé, conjuntament amb factors ambientals, condueixen a una disfunció de la cèl·lula β que no pot alliberar d'una forma regulada la insulina en resposta a la glucosa. Les causes moleculars de la resistència a la insulina són diverses i es coneixen només parcialment. Se sap que la disminució en el nombre de receptors d'insulina i mutacions en el propi receptor poden alterar l'afinitat per l'hormona, i que les alteracions post-receptor poden afectar també a la transducció del senyal de la insulina. Cal considerar també, les alteracions dels mecanismes de transport de glucosa i la seva utilització (Bell, 2001). A part però, d'aquestes causes més metabòliques, es considera que la resistència a la insulina està també molt associada a la producció de mediadors inflamatoris, per part dels teixits perifèrics, que donen lloc

a nivells circulants elevats de citokines inflamatòries, com per exemple IL-6 i TNF α (Mandrup-Poulsen, 2003)

En estadis inicials de la malaltia, que podríem anomenar de pre-diabetis, les cèl·lules β intenten compensar aquesta resistència a la insulina incrementant la massa de cèl·lula β i/o la secreció d'insulina, per poder mantenir així la tolerància a la glucosa. A la llarga però, la pròpia hiperglucèmia pot alterar la secreció d'insulina i comportar un efecte tòxic per la pròpia cèl·lula β i, en conseqüència, empitjorar encara més la resistència a la hormona. És per això que en alguns casos s'acaba donant una inactivació de les cèl·lules β del pàncrees i, per tant, aquests pacients inicialment descrits com a diabètics tipus 2, poden acabar sent també insulino-dependents. Així doncs, el procés diabètic, només es dona quan les cèl·lules β no són capaces de continuar compensant aquesta resistència i es produeix la mort d'aquestes cèl·lules (Kahn, 2001; Weir, 2001; Kasuga, 2006). Les alteracions en la funcionalitat de les cèl·lules β serien doncs un component clau, i no una simple conseqüència en la patologia de la diabetis tipus 2 (Kahn, 2003; Marchetti, 2006).

Són diversos els mecanismes que es considera que poden contribuir a l'apoptosi de les cèl·lules β en els pacients de diabetis tipus 2: una hiperglucèmia persistent, nivells elevats d'àcids grassos lliures o la presència de citokines inflamatòries (Mandrup-Poulsen, 2003). A part de la presència d'aquestes citokines (Pickup, 1998; Syed, 2002), altres alteracions que sempre s'havien associat al procés de la diabetis tipus 1, es detecten també en els illots pancreàtics d'individus amb diabetis tipus 2, com per exemple, la senyalització Fas-FasL, la producció d'IL1 β (Maedler, 2001; Maedler 2002) o la presència d'anticossos contra cèl·lules de l'illot (ICAs) i contra GAD (Pietro Paolo, 2000).

Donades aquestes afirmacions, certs grups suggereixen que la diabetis tipus 1 i la diabetis tipus 2, tot i ser malalties etiològica i genèticament molt diferent, comparteixen mecanismes moleculars que acaben donant lloc a l'alteració de les cèl·lules β . Els estímuls immunològics en el cas de la diabetis tipus 1, i els metabòlics/ inflamatoris en el cas de la diabetis tipus 2 convergeixen en una via de senyalització comuna que finalitza, en tots dos casos, amb la disfunció de les cèl·lules β pancreàtiques. Podrien tractar-se, per tant, de dues evolucions d'una mateixa malaltia, que es distingirien únicament per la rapidesa en la mort de les cèl·lules β i pels mecanismes iniciadors i efectors d'aquest procés (Mathis, 2001; Donath, 2003; Mandrup-Poulsen, 2003; Donath, 2005). En tots dos casos, factors ambientals actuarien com a factors acceleradors en individus genèticament susceptibles. Aquests factors ambientals podrien ser la dieta, infeccions víriques, estrès o certs antibiòtics en el cas de la diabetis tipus 1; i la obesitat, l'estrès o el sedentarisme per la diabetis tipus 2 (Wilkin, 2001).

3.1. ETAPES EN LA DISFUNCIÓ DE LA CÈL·LULA β DURANT EL PROCÉS DIABÈTIC.

En el desenvolupament de la diabetis tipus 2 són de gran importància factors com la resistència a la insulina, la obesitat i la manca d'exercici físic. Però el procés diabètic només es dóna quan les cèl·lules β no són capaces de compensar la creixent resistència d'insulina (Weir, 2001). Aquesta adaptació i intent de compensació que es dóna en les cèl·lules β durant la progressió a diabetis s'ha dividit en 5 nivells diferents, cada un dels quals implica canvis en la massa, fenotip i funció de la cèl·lula β . Tot i que aquesta progressió s'ha estudiat sobretot a nivell de diabetis tipus 2, en el desenvolupament de la diabetis tipus 1 hi podríem trobar també, canvis molt similars (Weir, 2004).

NIVELL 1: COMPENSACIÓ.

En estadis inicials de resistència a la insulina, es dóna un increment en la secreció de la hormona que permetrà fer front a aquesta resistència i seguir mantenint la normoglicèmia. Aquest increment ve donat per un augment tant en la secreció de les cèl·lules β , com en la massa de cèl·lula β , tal i com s'ha observat en autòpsies de pacients humans i en diversos models animals (Maclean, 1955; Butler, 2003; Pick, 1998). Aquest augment en la massa de cèl·lula β es dóna principalment per un increment en el número de cèl·lules, tot i que la hipertròfia de les cèl·lules β també hi pot contribuir. Durant aquesta fase els nivells de glucèmia es mantindrien normals gràcies a aquesta compensació, i el fenotip de les cèl·lules β no es veuria afectat. Tot i que la compensació es considera sempre que és enfront la resistència a la insulina, durant les primeres fases de la destrucció autoimmune, en la diabetis tipus 1, es donarien fenòmens molt similars als descrits en aquesta etapa.

NIVELL 2: ADAPTACIÓ ESTABLE.

Aquest nivell es dóna quan la compensació de les cèl·lules β ja no és suficient, i els nivells de glucèmia ja no es mantenen dins de la normalitat, sinó que els valors de glucèmia en dejú serien de 89-130 mg/dL. Durant aquesta fase es donen canvis importants en les funcions i diferenciació de les cèl·lules β . L'alteració més important és la pèrdua del primer pic de secreció d'insulina en resposta a glucosa. La secreció enfront a altres secretagogs, com pot ser l'arginina, es manté dins de la normalitat. Tot i la pèrdua del primer pic, la segona fase de secreció no es veu pràcticament alterada, fet que demostra que els mecanismes que es troben més alterats són els de captació de la glucosa i secreció de la insulina, i no pas els de síntesi d'aquesta.

La pèrdua de la resposta aguda a glucosa ve donada per canvis en el fenotip de la cèl·lula β . Així, certs gens normalment expressats a nivells elevats en les cèl·lules β (Glut2, glucoquinasa, mGPDH, Pdx1, HNFs, Nkx6.1, entre altres) disminueixen els seus nivells d'expressió; i en canvi, altres gens normalment no expressats s'activen (lactat deshidrogenasa, glucosa-6-fosfatasa, NF- κ B, *c-myc*, gens de resposta a estrès, gens antiapoptòtics i antioxidants). Tot i això, els nivells de mRNA d'insulina no es veuen alterats. Totes aquestes alteracions s'han pogut observar en nombrosos models animals i en diferents estudis de resposta de les cèl·lules β a concentracions elevades de glucosa (Tokuyama, 1995; Jonas, 1999; Laybutt, 2002; Maedler, 2002). Aquesta fase es considera força estable, pel fet que si no es dona cap procés que indueixi una mort ràpida de les cèl·lules β , com per exemple un atac autoimmune, molts individus poden romandre-hi durant anys.

NIVELL 3: PRIMERA DESCOMPENSACIÓ.

Ens trobem davant d'individus que presenten valors de glucèmia en dejú d'entre 150 i 280 mg/dL, dintre del rang diabètic. Excepte per la hipertròfia de les cèl·lules β , els illots mantenen una estructura normal. A part de la marcada intolerància a la glucosa, en aquesta etapa també es dona una alteració en la secreció d'insulina en resposta a molts altres secretagogs. Es dona una disminució en la síntesi d'insulina, probablement deguda a una disminució de la seva expressió. La diferenciació de la cèl·lula β està clarament alterada amb canvis en l'expressió de molts gens metabòlics i de factors de transcripció claus pel funcionament d'aquestes cèl·lules.

Aquesta etapa es considera força inestable pel fet que els factors que condueixen a ella, com poden ser la resistència a la insulina, la glucotoxicitat i la lipotoxicitat, fomenten encara més l'alteració a les cèl·lules β , i la manca de secreció d'insulina, agreujant encara més la situació, i fent que els nivells de glucosa en sang segueixin incrementant ràpidament. El tractament dels pacients diabètics tipus 2 amb dieta, exercici i certs fàrmacs, fa que alguns individus retornin ràpidament a estadis de nivell 2, i que es mantinguin en aquest nivell tant de temps com continuïn amb el tractament, sense que la malaltia continuï evolucionant.

NIVELL 4: DESCOMPENSACIÓ ESTABLE.

Estudis postmortem en pàncrees de pacients diabètics tipus 2 evidencien el fet que en aquesta etapa hi ha una disminució d'aproximadament el 50% de la massa de cèl·lula β i un increment en l'apoptosi d'aquestes cèl·lules (Maclean, 1955; Butler, 2003). De totes maneres l'apoptosi resulta difícil de quantificar en aquestes situacions tant cròniques, com pot ser la diabetis tipus 2. Estudis amb models animals demostren que, en molts casos, aquesta reducció

de la massa de cèl·lules β ve acompanyada també per alteracions estructurals a nivell dels illots (formació de les plaques d'amiloid, acumulació de glucogen i de lípids en les cèl·lules β , i fibrosi). En molts pacients diabètics tipus 2, aquesta etapa pot durar tota la vida, ja que els nivells d'insulina, tot i ser molt baixos, són suficients com per no donar lloc a cetoacidosis. En canvi, en el cas de diabetis tipus 1, la progressiva destrucció autoimmune els condueix ràpidament del nivell 2 al nivell 5 (Weir, 2004).

NIVELL 5: DESCOMPENSACIÓ SEVERA.

En aquesta última etapa, la pèrdua de cèl·lules β , i conseqüent manca de secreció d'insulina, és tant severa que els pacients desenvolupen cetoacidosis i passen a dependre del tractament amb insulina exògena per la seva supervivència. Els nivells de glucèmia en dejú solen ser superiors al 350 mg/dL. Aquesta situació és la que es dona en els pacients diabètics tipus 1, quan la major part de les cèl·lules β ja han estat destruïdes pel sistema immune. En el cas de pacients diabètics tipus 2, no és tant comú, però també es dona.

3.2. MODELS ANIMALS ESPONTANIS DE DIABETIS TIPUS 2.

Existeixen múltiples models animals espontanis de diabetis tipus 2, i, tot i que cap model presenta exactament els mateixos síndromes que la diabetis humana, molt dels processos involucrats són similars i poden ajudar a estudiar la patologia en els humans. Alguns dels models més estudiats són el ratolins ob/ob, ratolins db/db, ratolins NZO (*New Zeland Obese mice*), rates ZDF (*Zucker diabetic fatty rats*), i les rates GK (*Goto-Kakisaki*) entre molts altres. La patologia diabètica en alguns d'aquests models es dona per mutacions gèniques puntuals, en altres les causes són poligèniques i més desconegudes. Alguns models són obesos i resistent a la insulina, mentre que altres presenten resistència a la insulina i alteracions en la seva secreció, però sense presentar obesitat (Taula 1). La heterogenicitat observada entre els diferents models animals, i també en els humans, probablement reflexa la complexa interacció i influència de molts factors, tant genètics com ambientals, en el desenvolupament de la patologia (Pickup & Williams, 2003).

	Factors genètics	Pes	Ingesta	Glucèmia	Evolució insulinèmia	Alteracions
ratolins db/db	herència autosòmica recessiva mutació receptor de la leptina	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑ / N / ↓	Resistència a la insulina Hiperplàsia cèl·lules β Degeneració de les cèl·lules β en estadis més avançats
ratolins ob/ob	herència autosòmica recessiva mutació gen de la leptina	↑↑	↑↑	↑	↑↑	Resistència a la insulina Hipertròfia dels illots i de les cèl·lules β
ratolins NZO	Influència poligènica	↑↑	↑	↑	↑ / ↑↑	Resistència a la insulina Intolerància a la glucosa Alteracions funcionals en les cèl·lules β Illots hiperplàsics, hipertròfics i d'estructura alterada
rates ZDF	herència autosòmica recessiva mutació receptor de la leptina	↑	↑	↑ / ↑↑	↑	Resistència a la insulina, intolerància a la glucosa, pèrdua GSIS. Alteracions funcionals en les cèl·lules β
rates GK	Influència poligènica	N	N	↑	N / ↓	Marcada intolerància a la glucosa degut a la pèrdua GSIS Alteracions funcionals en les cèl·lules β. Illots allargats, desorganitzats i amb fibrosi

Taula 1. Característiques d'alguns dels models animals espontanis de diabetis tipus 2. ↑, increment moderat; ↑↑, increment sever; ↓, disminució moderada; ↓↓, disminució severa; N, normal; GSIS, secreció d'insulina en resposta a glucosa (adaptació de Pickup & Williams, 2003).

3.2.1. Animals transgènics que sobreexpressen IGF-II en les cèl·lules β pancreàtiques.

A part dels múltiples models murins de diabetis espontània, existeixen també diversos animals transgènics que desenvolupen les característiques pròpies d'aquesta patologia. En el nostre laboratori s'havien generat ratolins transgènics que expressaven IGF-II en les cèl·lules β pancreàtiques, sota el control del promotor del gen de la insulina-I de rata (ratolins RIP/IGF-II). Aquests animals, en fons genètic C57BL/6;SjL, presenten característiques pròpies d'un estat pre-diabètic tipus 2, però no acaben desenvolupant diabetis (Devedjian, 2000). Presenten una lleugera hiperglucèmia, hiperinsulinèmia, i una marcada intolerància a la glucosa. La hiperinsulinèmia, a la llarga, en animals transgènics de 4 mesos d'edat, acaba donant lloc a resistència a la insulina. Quan aquests animals s'alimenten amb una dieta alta en lípids, un 30% dels ratolins transgènics IGF-II desenvolupen diabetis oberta.

Aquests animals transgènics RIP/IGF-II presenten nivells elevats de mRNA d'IGF-II en els seus illots, un increment de 3 vegades de la massa de cèl·lula β i una morfologia alterada dels seus illots. Aquest increment en la massa es dona per un increment en el número de cèl·lules β (hiperplàsia) dels illots, presenten doncs, uns illots més grans i de formes més allargades i irregulars. La organització de les cèl·lules dins dels illots està també alterada. Les cèl·lules α productores de glucagó es troben distribuïdes per tot l'illot i no només en la seva perifèria. No presenten però alteracions en el percentatge de cèl·lules α , δ i PP. Alteracions morfològiques similars s'han observat en alguns altres models animals de diabetis tipus 2 i obesitat, com per exemple les rates ZDF, Goto-Kakisaki i els ratolins NZO (Tokuyama, 1995; Hoog, 1996; Chankiewicz, 2006). Els animals RIP/IGF-II presenten uns nivells circulants d'IGF-II molt baixos, es creu per tant, que les alteracions pre-diabètiques observades són probablement degudes a un efecte local de l'IGF-II sobre les cèl·lules β dels illots, i no degudes a un efecte sistèmic d'aquest (Devedjian, 2000).

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

La diabetis mellitus tipus 1, a diferència de la tipus 2, és deguda a la deficiència d'insulina resultant de la destrucció autoimmunitària de les cèl·lules β pancreàtiques, productores d'insulina. Com a conseqüència de la seva destrucció es produeix una gran disminució de l'hormona (hipoinsulinèmia). La destrucció d'aquestes cèl·lules per part del propi sistema immunitari és progressiva. No obstant, els símptomes de la malaltia, no es manifesten fins que ja s'han destruït el 90% de les cèl·lules β . Les cèl·lules productores de glucagó, somatostatina i polipèptid pancreàtic normalment es preserven, tot i que solen redistribuir-se dins de l'illot.

La hipoinsulinèmia dona lloc a l'alteració metabòlica més important d'aquesta patologia, la hiperglucèmia. Aquesta és deguda a la incapacitat dels teixits perifèrics (múscul i teixit adipós) i fetge de captar i metabolitzar la glucosa. A més, els nivells baixos d'insulina fan que s'activin la via gluconeogènica i glucogenolítica en el fetge, contribuint a augmentar encara més els nivells de glucosa en sang. Per altra banda, els pacients diabètics necessiten obtenir energia d'altres substrats. Una possible font d'energia alternativa són els cossos cetònics provinents de la metabolització d'àcids grassos lliures des del teixit adipós i la seva posterior oxidació en el fetge. La producció de cossos cetònics porta a una cetoacidosi. Els pacients diabètics requereixen de l'administració d'insulina exògena per poder sobreviure. Aquesta teràpia substitutòria és imprescindible, no només per controlar la hiperglucèmia sinó també per evitar la cetosi espontània que pot portar al coma diabètic o fins i tot a la mort del pacient. Això no evita però, que molts pacients acabin desenvolupant patologies secundàries associades a la diabetis, com són les alteracions microvasculars en el ronyó, retina, alteracions macrovascular i complicacions neurològiques (Lowe, 1998).

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

Tal i com s'ha descrit per la diabetis tipus 2, en la patogènesi de la diabetis tipus 1, hi ha involucrats tant factors ambientals, com factors genètics. Mitjançant estudis genètics s'han descrit varis locus del genoma que estan associats amb el desenvolupament de la malaltia, però certs estudis en bessons monozigòtics, demostren que els factors ambientals també hi participen. De manera similar al desenvolupament de diabetis tipus 2, diversos factors ambientals poden iniciar o accelerar el progrés de la malaltia i, en aquest cas, activar els mecanismes autoimmunitaris, en individus genèticament susceptibles (Zimmet, 2001; Haverkos, 1997).

4.1.1. Factors genètics.

Actualment, s'han identificat més de vint regions del genoma humà implicades en la predisposició i/o acceleració del desenvolupament de la diabetis tipus 1 (Freiesleben De Blasio, 1999). Les regions més importants estan llistades a la Taula 1. Les dues associacions amb una contribució més forta són els anomenats *locus IDDM1* i *locus IDDM2*. El *locus IDDM1* inclou tots els polimorfismes associats als al·lels de les molècules del complex major d'histocompatibilitat (HLA/ MHC) i implica aproximadament el 40% dels casos de diabetis familiar (Todd, 1996). D'altra banda, l'anomenat *locus IDDM2*, correspon a la regió del gen de la insulina (Bell, 1884; Hitman, 1985). Aquest últim afecta a un 10% dels casos de diabetis familiar. Els casos restants vindrien donats per associacions a la resta de regions descrites en la Taula 2.

Nom	Localització cromosòmica	Marcador
<i>IDDM1</i>	6p21 (complex major d'histocompatibilitat)	<i>HLA-DQB</i>
<i>IDDM2</i>	11p15 (<i>INS</i>)	<i>INS-VNTR</i>
<i>IDDM3</i>	15q26	<i>D15S107</i>
<i>IDDM4</i>	11q13	<i>FGF3</i>
<i>IDDM5</i>	6q25	<i>ESR1</i>
<i>IDDM6</i>	18q21	<i>D18S64</i>
<i>IDDM7</i>	2q31	<i>D2S152</i>
<i>IDDM8</i>	6q27	<i>D6S264</i>
<i>IDDM9</i>	3q21-q25	<i>D3S1576</i>
<i>IDDM10</i>	10p13-q11	<i>D10S193</i>
<i>IDDM11</i>	14q24-q31	<i>D14S67</i>
<i>IDDM12</i>	2q33	<i>CTLA4</i>
<i>IDDM13</i>	2q34	<i>D2S301</i>
<i>IDDM14</i>	No publicat	
<i>IDDM15</i>	6q21	<i>D6S283</i>
<i>IDDM16</i>	No publicat	
<i>IDDM17</i>	10q25	
<i>IDDM18</i>	5q33-34	<i>IL12B</i>
-	14q12-q21	<i>D14S70-76</i>
-	16q22-q24	<i>D16S515-520</i>
-	19p13	<i>D19S247-226</i>
-	19q13	<i>D19S225</i>
-	1q	<i>D1S1644-AGT</i>
-	Xp13-p11	<i>DX1068</i>

Taula 2. Regions del genoma humà associades a la susceptibilitat a desenvolupar diabetis tipus 1 (adaptació de Pickup & Williams, 2003).

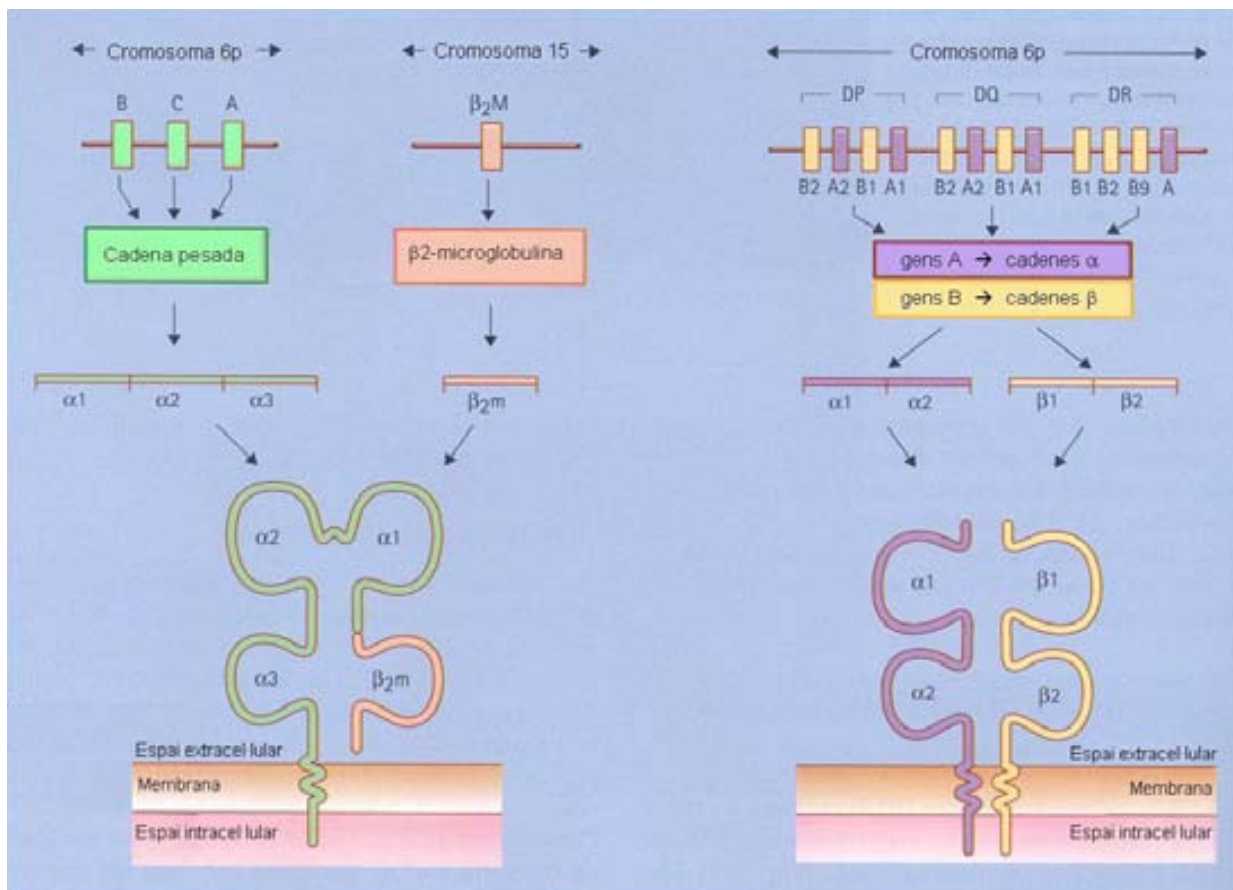
4.1.1.1. *Locus IDDM1.*

Aquest locus inclou els polimorfismes associats als al·lels de les molècules del complex major d'histocompatibilitat (MHC). Aquests polimorfismes són els més importants pel que fa a la susceptibilitat a desenvolupar diabetis tipus 1, ja que aquestes molècules determinen, per una banda, els pèptids que s'uneixen i es presenten a les cèl·lules T, i per altra banda, defineixen també el repertori de limfòcits T a nivell tímic.

El complex major d'histocompatibilitat és un conjunt de gens, localitzats en el cromosoma 6 en humans i en el 17 murí, que codifiquen per un grup de glicoproteïnes de membrana denominades molècules de MHC (Tussey, 1995). Aquestes molècules uneixen antigens processats dins de les cèl·lules i els presenten en la superfície cel·lular a les diferents poblacions de limfòcits T. Els polimorfismes en aquest gens són importants, ja que afecten a l'espectre de pèptids que unirà la molècula, la conformació dels pèptids units i la interacció directa amb els receptors TCR de les cèl·lules T. D'aquesta manera, les cèl·lules T reconeixeran els pèptids units a una determinada variant al·lèlica de MHC, però no el mateix pèptid unit a un altre MHC. En humans, aquesta molècula s'anomena també HLA (*human leucocyte antigen*). Les molècules de MHC es divideixen en dues classes (I i II) que es diferencien per la seva funció, estructura i distribució (Esquema 4):

- Les molècules de *MHC de classe I* estan formades per dues cadenes polipeptídiques. Una cadena alfa o pesada, polimòrfica, codificada en els gens MHC, i una cadena més petita anomenada β_2 -microglobulina. Aquesta cadena petita no és polimòrfica, es troba associada covalentment a la cadena alfa i és codificada per un gen localitzat en un altre cromosoma. En humans existeixen 3 gens principals de classe I, que codifiquen per la cadena alfa, s'anomenen HLA-A, -B i -C i, en ratolins, 3 gens que s'anomenen H-2K, -D i -L (Esquema 4). Aquestes molècules uneixen i presenten pèptids sintetitzats en el citosol de la pròpia cèl·lula, que provenen del metabolisme cel·lular i del processament de virus i bacteris que es repliquen en el citosol. La molècula de MHC de classe I, amb el seu pèptid unit, és reconeguda pel receptor TCR de les cèl·lules T $CD8^+$ citotòxiques, que, mitjançant diferents mecanismes, determinaran l'eliminació de les cèl·lules diana. Les molècules MHC de classe I s'expressen en totes les cèl·lules nucleades de l'organisme. La seva expressió però, es pot veure incrementada per l'acció d'interferons (IFNs) de tipus 1, els quals promouen la resposta immunitària adaptativa en front els virus. D'aquesta manera es facilita la presentació de fragments peptídics virals per part de les cèl·lules infectades als limfòcits T citotòxics (Janeway, 2003).
- Les molècules de *MHC de classe II* estan formades per dues cadenes polimòrfiques, α i β , que s'uneixen de forma no covalent. En humans existeixen 3 gens principals de classe II que s'anomenen HLA-DR, -DP i -DQ, i en ratolins 2 gens anomenats H-2A i H-2E (Esquema 4). Aquestes molècules no s'expressen en totes les cèl·lules de l'organisme, sinó que la seva expressió es restringeix a les cèl·lules presentadores d'antígens (APC) del sistema immunitari (macròfags, cèl·lules dendrítiques, limfòcits B i limfòcits T). Aquestes molècules presenten fonamentalment pèptids externs o que provenen de la membrana plasmàtica i que han estat processats per la via endocítica. La molècula MHC de classe II amb el pèptid unit

és reconeguda per les cèl·lules T CD4⁺. Les cèl·lules T CD4⁺ o T *helper* activen principalment macròfags i limfòcits B (Abbas, 1995). La regulació gènica del MHC de classe II es dona principalment a nivell de transcripció i és controlada de forma pràcticament exclusiva per un coactivador anomenat CIITA (*Class II transactivator*) (Ting, 2002; Steimle, 1994; LeibundGut-Landmann, 2004). L'expressió del gen CIITA ve regulat a la vegada per l'activació de 3 promotors independents que donen lloc, cada un d'ells, a una isoforma diferent del transactivador (Reith, 2005). La isoforma I (CIITApI) es detecta en les cèl·lules dendrítiques (DC) i macròfags activats. La isoforma III (CIITApIII) en limfòcits B i T activats i, finalment, la isoforma IV (CIITApIV) s'ha descrit en les cèl·lules epitelials del timus i en cèl·lules no presentadores d'antigen. Així doncs, l'expressió ectòpica de MHC de classe II, és a dir, en cèl·lules que no són APC, vindria donada per l'expressió de la isoforma CIITApIV (Harris, 2006).



Esquema 4. Estructura de les molècules del complex major d'histocompatibilitat (MHC/HLA) de classe I i de classe II, i dels gens que codifiquen per les diferents cadenes que els formen (adaptació de Pickup & Williams, 2003).

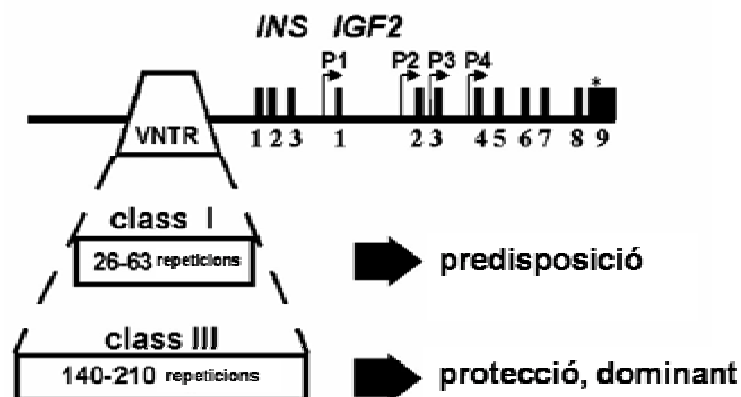
Variacions estructurals en les cadenes α i β de les diferents molècules MHC poden induir canvis en la unió dels antígens o autoantígens i la seva posterior presentació als limfòcits T, així com també en l'estabilitat de les molècules de MHC a la superfície cel·lular i a la capacitat

d'interacció d'aquestes amb els diferents receptors TCR dels limfòcits T. Això també podria afectar el fenotip dels diferents limfòcits (proinflamatoris vs. reguladors) i en el seu estat d'activació (proliferatiu o no) (Kwok, 1996; Ettinger, 1998; Nepom, 1998). Variacions en aquestes molècules poden incrementar per tant, la susceptibilitat a desenvolupar malalties autoimmunitàries com per exemple la diabetis tipus 1.

4.1.1.2. Locus IDDM2.

Estudis en pacients diabètics tipus 1 determinaren una associació entre la regió gènica de la insulina i la susceptibilitat a la malaltia (Bell, 1984; Hitman, 1985). Aquesta regió va rebre el nom de *locus IDDM2*. El seu efecte és menor que el del *locus IDDM1*, i sembla que actuen de manera independent. El locus *IDDM2*, situat en el cromosoma 11p15.5 en els humans, conté varis gens que codifiquen per la insulina, el factor de creixement similar a la insulina-2 (IGF2) i la tirosina hidroxilasa (TH). En aquest locus s'hi ha descrit una regió polimòrfica anomenada *insulin gene variable number tandem mini-satellite repeats (INS-VNTR)* localitzada a uns 596 pb *upstream* del gen de la insulina, i a unes 4kb del gen de l'IGF2 (Lucassen, 1993; Undlien, 1995; Bennett, 1995). Aquest VNTR està compost per un nombre variable de repeticions d'una seqüència consens d'uns 14-15pb (ACAGGGGT(C/CC/G)TGGGG), que poden anar des de les 25, fins a més de 300 repeticions.

Els diferents al·lels d'aquest minisatèl·lit es classifiquen en tres grans categories segons el nombre de repeticions que presentin: VNTR de classe I (26-63 repeticions), VNTR de classe II (64-139 repeticions) i VNTR de classe III (140-210 repeticions). Els segments curts (VNTR classe I) s'associen a una major susceptibilitat a desenvolupar diabetis, els segments llargs (VNTR classe III), en canvi, confereixen un efecte protector dominant. Els segments intermitjos (VNTR classe II) són molt poc freqüents entre la població caucàsica (Bell,1982; Rotwein,1986; Bennett, 1996) (Esquema 5).



Esquema 5. Estructura del locus IDDM2 localitzat en el cromosoma 11p15.5, identificat com el minisatèl·lit VNTR situat *upstream* dels gens de la insulina i de l'IGF2 (adaptació de Vafiadis, 1998b).

El minisatèl·lit VNTR no es transcriu, per tant el seu efecte sobre la susceptibilitat a desenvolupar diabetis ha d'implicar el control dels nivells d'expressió dels gens pròxims. Els VNTR de classe I estan associats a nivells més alts d'expressió d'insulina a pàncrees, tant a nivell fetal com en adults, comparat amb els VNTR de classe III. (Bennett, 1995; Vafiadis, 1996) Contràriament, a nivell de timus s'observa un patró d'expressió oposat, amb uns nivells d'expressió d'insulina de 2 a 3 vegades més alts en presència dels VNTR de classe III (Vafiadis, 1997; Pugliese, 1997). Aquests nivells més alts d'expressió d'insulina associats als al·lels de classe III explicarien el seu efecte protector enfront la diabetis, ja que una expressió més alta d'insulina a timus permetria induir una millor tolerància envers aquesta proteïna, promovent una millor selecció negativa dels limfòcits reactius per insulina i, disminuint així les probabilitats d'una resposta autoimmune contra les cèl·lules β pancreàtiques (Vafiadis, 2001). De la mateixa manera, nivells baixos d'expressió d'insulina a timus, observats en els VNTR de classe I, podrien donar lloc a un elevat nombre de cèl·lules T autoreactives per aquest antigen (Chentoufi, 2002).

A part dels efectes descrits sobre la transcripció del gen de la insulina, també és possible que els diferents al·lels del VNTR afectin a la transcripció del gen de l'IGF2. Aquest gen es transcriu a partir de 4 promotors (P1, P2, P3 i P4) (van Dijk, 1991) situats entre 4-17kb *downstream* del VNTR, distància compatible amb l'efecte *enhancer* del minisatèl·lit. Els estudis dels efectes dels diferents VNTR sobre l'expressió del gen IGF2 són controvertits. Així, certs estudis consideren que els al·lels de classe I estan associats a un increment de l'expressió d'IGF2 a nivell pancreàtic i de placenta (Paquette, 1998); mentre que altres no observen diferències en els nivells d'expressió d'aquest gen, ni a timus, ni a pàncrees, degudes al VNTR (Vafiadis, 1998a). Tot i la controvèrsia es considera que, possiblement, el gen diana en aquest *locus* seria principalment el de la insulina, però, el gen d'IGF2 podria tenir també un efecte, tot i que no seria tant directe com l'observat pel cas de la insulina (Gennen, 1993; Polychronakos, 1995; Vafiadis, 1998b).

El mecanisme pel qual el VNTR influenciaria la transcripció dels diferents gens es considera que és degut a que la llargada del VNTR pot fer variar l'estructura de la cromatina en aquesta regió del genoma. En funció del nombre de repeticions, i per tant de la llargada de la regió, la cromatina farà més o menys super-estructures, modulant així l'accessibilitat dels diferents factors de transcripció als gens de la insulina i de l'IGF2, i, per tant, influint en els nivells de transcripció d'aquests gens (Banerjee, 1995). Possiblement, els efectes del VNTR descrits pel gen de la insulina són més pronunciats que no els descrits pel gen de l'IGF2 degut a la major proximitat del gen de la insulina al VNTR.

Cert estudis genètics en pacients humans demostren que la presència dels al·lels de predisposició del locus *IDDM2*, en combinació amb els al·lels *IDDM1*, incrementen molt el risc a desenvolupar diabetis tipus 1, donant lloc a un grup de població que presenta un risc molt elevat de desenvolupar la patologia (Motzo, 2004).

4.1.2. Factors ambientals.

Tot i la importància dels factors genètics en l'etiologia de la diabetis tipus 1, estudis de germans bessons monozigòtics, i d'incidència en diferents poblacions, suggereixen també un paper significatiu dels factors ambientals en el seu desenvolupament (Lowe, 1998). Aquests factors influenciarien individus genèticament susceptibles (Zimmet, 2001). Alguns dels factors ambientals que s'han relacionat amb la diabetis són per exemple:

- *factors geogràfics i estacionals*: sembla existir un gradient nord-sud, amb un augment de la incidència en els països més allunyats de l'equador, amb l'excepció de Sardenya i Islàndia. S'ha descrit també una incidència estacional de la malaltia (Åkerblom, 1998).
- *factors dietètics*: s'ha descrit que dietes riques en albúmina sèrica bovina (BSA), podrien induir el desenvolupament de diabetis en infants. Les nitrosamines i el gluten també són potencialment diabetogènics (Schrezenmeir, 2000).
- *certes infeccions víriques*: alguns virus com el Coxsackie virus B4 (CB4) poden actuar destruint directament les cèl·lules β , induint l'atac autoimmune contra elles, i estimulant la síntesi d'interferons de tipus 1 i la hiperexpressió d'antígens HLA de classe I en les cèl·lules β (Andreoletti, 1997).
- *alguns antibiòtics*: L'antibiòtic bafilomicina A1, produït per espècies de *Streptomyces*, causa una reducció de la tolerància a la glucosa i una disfunció dels illots pancreàtics en ratolins. Els *Streptomyces* són ubiqües i presents en el sòl, i alguns poden infectar tubercles com les patates. L'exposició continuada a la toxina podria arribar a generar dany crònic en les cèl·lules β i provocar diabetis autoimmune en individus genèticament susceptibles (Myers, 2001).
- *L'estrès*: aquest pot estimular la secreció d'hormones contrareguladores o modular l'activitat del sistema immune, i per tant afavorir el desenvolupament de la malaltia en individus genèticament susceptibles (Zimmet, 2001).

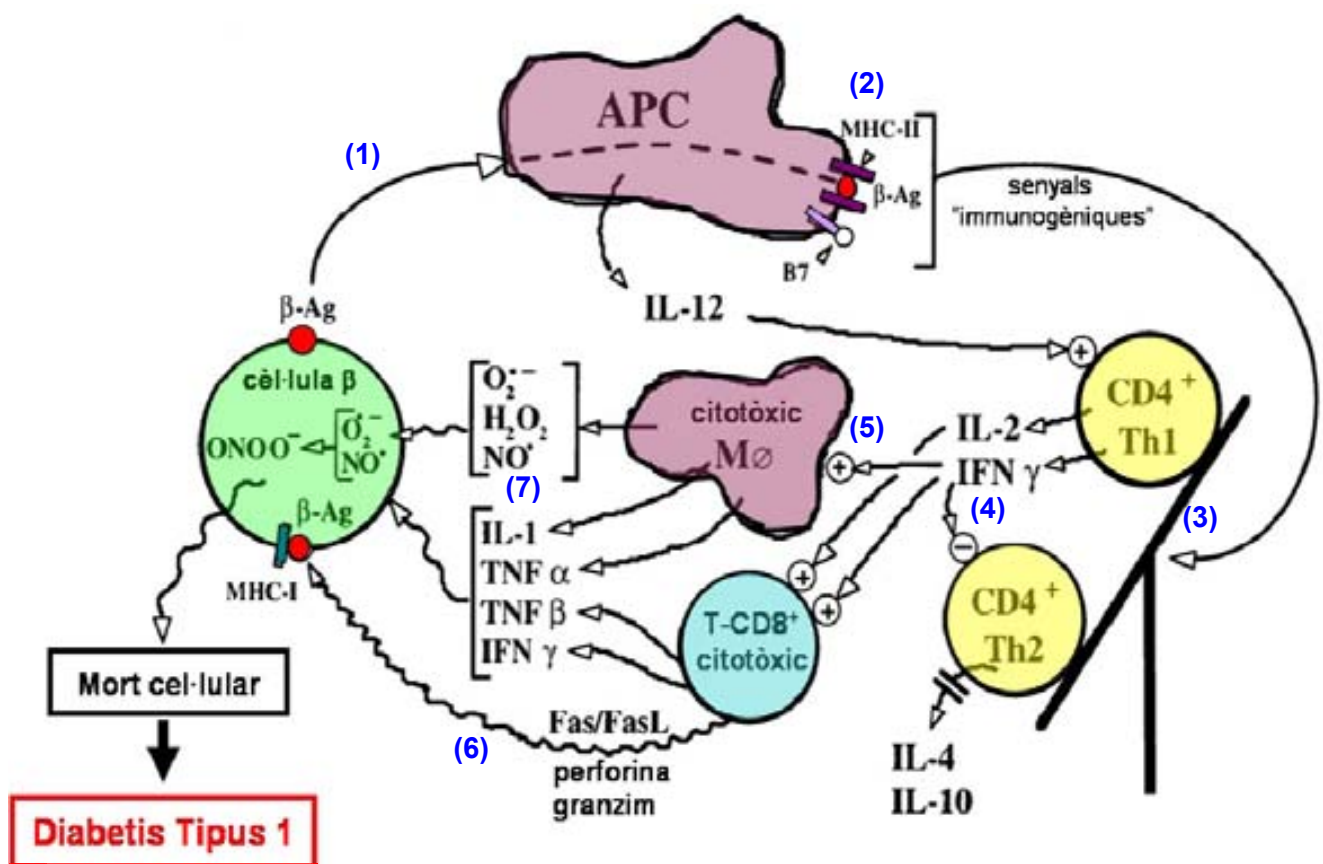
4.2. DESTRUCCIÓ AUTOIMMUNE.

L'autoimmunitat es dona quan el sistema immune ataca els teixits propis i sans, contràriament a les que serien les seves funcions normals de defensa de l'organisme enfront microorganismes externs i cèl·lules tumorals. La capacitat dels sistema immune de no reaccionar contra molècules pròpies s'anomena tolerància i una alteració en els mecanismes que mantenen aquesta tolerància dona lloc a l'autoimmunitat. En el cas de la diabetis tipus 1, aquesta destrucció autoimmune es dona específicament contra les cèl·lules β pancreàtiques, productores d'insulina. No està clar encara quin és l'inici de tot aquest procés, però sí que es coneix que hi intervenen autoantígens específics, cèl·lules presentadores d'antígens i limfòcits T i B.

En humans el seguiment del progrés de la malaltia és complicat per la dificultat d'accedir al teixit diana. En alguns estudis amb biòpsies pancreàtiques de pacients s'ha observat que els illots pancreàtics a l'inici clínic de la diabetis tipus 1 estan infiltrats majoritàriament per limfòcits T $CD8^+$ i presenten un número variable de limfòcits T $CD4^+$, limfòcits B i macròfags (Itoh, 1993; Imagawa, 2001). Aquesta infiltració es correlaciona, en alguns casos, amb la hiperexpressió de MHC de classe I, de classe II i molècules d'adhesió (*intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1 i *lymphocyte function-associated antigen-3*, LFA-3) tant en els illots com a nivell endotelial (Bottazzo, 1985; Foulis, 1986; Foulis, 1987; Somoza, 1994).

Les cèl·lules $CD8^+$ (Tc) s'anomenen citotòxiques perquè poden induir la mort de les cèl·lules de forma directa, via perforina i granzim (Kagi, 1997). A part d'aquest efecte citotòxic, també produeixen citoquines inflamatores (TNF β , TNF α i IFN γ) que estimulen la sobreexpressió de Fas en els illots; IFN γ i TNF α poden induir també l'expressió de molècules MHC-II a les cèl·lules β pancreàtiques (Kim, 2002). Les cèl·lules $CD4^+$ (Th, de *helper* o col·laboradora) en canvi, no són capaces de destruir les cèl·lules β directament, però produeixen citoquines que juguen també un paper molt important en la patogènesi de la diabetis. Les cèl·lules $CD4^+$ (Th) es poden dividir en tres subpoblacions diferents (Th1, Th2 i Th3) en funció de la resposta immune que afavoreixen (Abbas, 1995). Les citoquines produïdes per les cèl·lules Th1 (IL-2, IFN- γ i TNF β) estan involucrades en el desenvolupament de la malaltia, estimularien la resposta cel·lular (macròfags) i donarien màxima activitat a les cèl·lules $CD8^+$. En canvi, les citoquines produïdes per les cèl·lules Th2 (IL-4, IL-6 i IL-10) i Th3 (TGF β) estan més relacionades amb la immunitat humoral, han estat involucrades en la prevenció de la diabetis i amb la inhibició de les cèl·lules Th1 (Yoon, 2001).

Molts estudis semblen indicar que el desenvolupament de la diabetis tipus 1 és una qüestió d'equilibri entre les citoquines Th1 i les Th2 (Esquema 6). Quan els limfòcits presents en la infiltració dels illots produeixen nivells de citoquines proinflamatòries (IL-1, TNF α i IFN γ) i citoquines tipus Th1 (IFN γ , TNF β , IL-12 i IL-2), per sobre dels nivells de citoquines tipus Th2 (IL-4 i IL-10), es produeix la destrucció selectiva de les cèl·lules β . Pel contrari, la insulinitis sembla ser benigne, i s'evita la destrucció de les cèl·lules β , quan el nivell de citoquines Th2 dominen en l'infiltrat per sobre de les de tipus Th1 (Rabinovitch, 2003).



Esquema 6. Esquema de les cèl·lules i citoquines que intervien en la destrucció de les cèl·lules β i desenvolupament de diabetis tipus 1. Els autoantígens presents en les cèl·lules β activen les cèl·lules presentadores d'antígens (APCs), cèl·lules dendrítiques i macròfags principalment (1). Aquestes els presenten a les cèl·lules T CD4⁺ mitjançant molècules MHC-II (2). En funció de les citoquines presents en el microambient, les cèl·lules Th naif es desenvoluparan en cèl·lules Th1 o Th2 (3). Quan s'activen principalment cèl·lules Th1, aquestes produeixen citoquines proinflamatòries (IL-2, IFN γ) que inhibiran l'activació de cèl·lules Th2 (4) i activaran macròfags i cèl·lules T CD8⁺ (5). Aquestes, un cop activades actuen com a efectors finals de la destrucció de les cèl·lules β per diferents mecanismes: interacció directa amb els MHC-I de les cèl·lules β i mort per la via Fas/FasL o perforina/granzim (6), o mitjançant mediadors inflamatoris com per exemple radicals lliures (H₂O₂ i NO) i citoquines (IL-1, TNF α , IFN γ) (7). (Adaptació de Rabinovitch & Suarez-Pinzon, 1998).

4.3. MODELS ANIMALS DE DIABETIS TIPUS 1.

L'estudi de la patogènesis de la diabetis en humans resulta ser força complicat degut a: 1) que l'òrgan diana és força inaccessible, 2) que la seva manipulació pot comportar problemes greus, 3) que els processos que precedeixen l'inici clínic de la malaltia són asimptomàtics i poden durar de mesos fins a anys i 4) els processos patològics tenen lloc a nivell local dels illots i no es reflexen a nivell perifèric. Per tot això, la utilització de models animals en l'estudi de la diabetis tipus 1 ha estat decisiva per poder examinar els mecanismes involucrats en el desenvolupament d'aquesta malaltia (Yoon, 2001). De particular importància han estat les soques que desenvolupen diabetis espontàniament, com són per exemple les rates BB (*BioBreeding Worcester*) o els ratolins NOD (*non-obese diabetic*). La utilització però, d'animals transgènics, i de models de diabetis experimental han permès també noves vies d'estudi.

4.3.1. Animals transgènics models de diabetis tipus 1.

La utilització d'animals transgènics ha resultat ser una eina molt poderosa per l'estudi de les bases moleculars de la diabetis tipus 1, especialment per l'estudi dels mecanismes que desencadenen les alteracions en la tolerància per les cèl·lules β . Els transgens expressats en les cèl·lules β inclouen antígens MHC, citoquines, proteïnes virals i autoantígens.

4.3.1.1. Animals transgènics que expressen antígens MHC.

La observació, en alguns casos, d'expressió de molècules de MHC-II en les cèl·lules β de pacients diabètics, de rates BB i ratolins NOD (Foulis, 1986; Dean, 1985; Hanafusa, 1987), ha portat a la qüestió de fins a quin punt aquesta expressió ectòpica i aberrant de molècules de MHC-II pot tenir un paper inductor en la destrucció autoimmune de les cèl·lules β durant la diabetis. Per tal d'abordar aquesta qüestió diversos grups han generat animals transgènics que sobreexpressen molècules MHC de classe II a nivell de cèl·lules β pancreàtiques.

L'expressió de les molècules I-A i I-E (homòlogues a la molècula de MHC de classe II humana), sota el control del promotor de la insulina dóna lloc a la inducció de diabetis, però curiosament, en cap dels dos casos s'observa infiltració limfocitària ni cap evidència de resposta immune en els pàncrees d'aquests animals (Sarvetnick, 1998; Lo, 1988). L'any 1989, J. Böhme *et al.*, generaren també un altre animal transgènic que sobreexpressa molècules de MHC de classe II a cèl·lules β pancreàtiques, però a nivells molt més baixos, sota el control d'un promotor menys fort que el de la insulina. Segons els autors, en aquest cas, els nivells d'expressió són molt més comparables als nivells que podrien trobar-se aquestes molècules en els pacients o animals diabètics. Aquests animals no desenvolupen diabetis, i tampoc s'observa infiltració limfocitària en

els seus illots (Böhme, 1989). Altres estudis, posteriors també demostren la importància dels nivells d'expressió d'aquestes molècules per induir diabetis, probablement un nivell crític d'expressió seria necessari perquè es donés l'aparició de la malaltia (Allison, 1990).

També s'han generat models transgènics que expressen molècules de MHC de classe I en les cèl·lules β pancreàtiques. La sobreexpressió de del gen H-2kb sota el promotor del gen de la insulina de rata indueix diabetis a un elevat percentatge dels animals, però tampoc s'observa infiltrat limfocitàri ni senyal de resposta autoimmune en els seus illots (Allison, 1988)

4.3.1.2. Animals transgènics que expressen citoquines.

La generació d'animals transgènics també ha resultat molt útil per aprofundir en el coneixement de la funció de diferents citoquines. L'expressió en animals transgènics de $IFN\alpha$, $INF\gamma$ i IL-2 a nivell de cèl·lules β pancreàtiques indueix una forta infiltració limfocitària que dona lloc a una destrucció progressiva dels illots i al desenvolupament de diabetis (Stewart, 1993; Sarvetnick, 1988; Allison, 1992). La sobreexpressió d' $IFN\gamma$ indueix, a més a més, l'expressió ectòpica de molècules de MHC de classe II (Sarvetnick, 1990). En canvi, l'expressió de $TNF\alpha$, $TNF\beta$ i IL-6 indueix una insulitis benigne, que no dona lloc a la destrucció dels illots, ni a diabetis (Higuchi, 1992; Picarella, 1993; Campbell, 1994). L'expressió d'IL-10 i $TGF\beta$ només dona lloc a una resposta inflamatòria localitzada a nivell periinsular, que tampoc progressa cap a diabetis (Wogensen, 1993; Sanvito, 1995). L'expressió transgènica d'aquestes citoquines s'ha realitzat també en ratolins NOD per comprovar el seu efecte en un model amb una elevada incidència de diabetis. L'expressió de $TNF\alpha$, IL-4 i IL-6 en ratolins NOD inhibeix el procés diabètic en aquests animals, en canvi, l'expressió d'IL-2 i d'IL-10 l'accelera (Grewal, 1996; Mueller, 1996; Di Cosmo, 1994; Allison, 1994; Wogensen, 1994). Aquests resultats suggereixen un paper més proinflamatori i patològic per les citoquines $IFN\gamma$, $IFN\alpha$, IL-2 i IL-10 en el desenvolupament de diabetis tipus 1, i un paper més protector, per $TNF\alpha$, IL-4, IL-6 i $TGF\beta$ (Rabinovitch i Suarez-Pinzon, 2003).

4.3.1.3. Animals transgènics que expressen $IFN\beta$ en les cèl·lules β pancreàtiques.

Tal i com s'ha comentat en apartats anteriors, un nombre important de citoquines poden alterar la funcionalitat de les cèl·lules β i per tant poden estar involucrades en el desenvolupament de diabetis tipus 1. L'expressió d' $IFN\beta$ és induïda en les cèl·lules epitelials per la infecció de diferents virus, i s'ha detectat la seva expressió en pacients diabètics tipus 1 (Somoza, 1994).

En el nostre laboratori es van generar ratolins transgènics que expressaven $IFN\beta$ humà en les cèl·lules β pancreàtiques, sota el control del promotor del gen de la insulina-I de rata (ratolins RIP/h $IFN\beta$). Aquests animals, en fons genètic C57BL/6;SJJL, presenten característiques pròpies d'un estat pre-diabètic, alteració funcional dels illots, secreció d'insulina estimulada per glucosa

alterada i certa hiperglucèmia, però no acaben desenvolupant diabetis (Pelegrin, 1998). Quan aquests animals es creuaren fins a 10 generacions amb la soca CD-1, i, en condicions d'estabulació SPF (*Specific Pathogen Free*), es va obtenir una colònia amb una incidència de diabetis espontània del 11% i una important infiltració limfocitària dels seus illots, principalment de cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺ (ratio 3:1) i algunes cèl·lules B (Alba, 2004; Casellas, 2006).

S'observa també una hiperexpressió de MHC de classe I a les cèl·lules β d'aquests animals, però no una hiperexpressió de molècules de MHC de classe II (Alba, 2004). Estudis recents amb aquests animals transgènics demostren que: 1) els animals NOD x RIP/hIFN β presenten una acceleració del procés diabètic; 2) la transferència de limfòcits d'un animal RIP/hIFN β diabètic a un ratolí NOD-SCID li accelera el procés diabètic; 3) els animals NOD-SCID x RIP/hIFN β no desenvolupen diabetis; i 4) Animals NOR (non-obese resistant mice) x RIP/hIFN β presenten també una elevada incidència de diabetis. L'expressió de β 2-microglobulina, preproinsulina i glucagó en el timus d'aquests animals no està alterada, fet que suggereix que l'estat pre-diabètic d'aquests és causat per un efecte local de l'IFN β a nivell pancreàtic. Tots aquests resultats demostren que el desenvolupament de diabetis en els animals RIP/hIFN β no és causat per una disfunció metabòlica de les cèl·lules β deguda a l'expressió del transgen, sinó que és clarament autoimmune (Alba, 2004).

4.3.2. Models de diabetis experimental, induïda per estreptozotocina.

Existeixen diversos agents químics, tòxics, específics per les cèl·lules β , que poden induir un procés diabètic molt similar al que es dona en humans. Un dels principals tòxics diabetogènics és l'estreptozotocina (STZ). Aquest és un antibiòtic d'ampli espectre que s'aïllà de cultius de *Streptomyces acrhomogenes*, d'estructura constituïda per una molècula de N-metil-N-nitrosurea unida al C-2 de la D-glucosa (Herr, 1967). Degut a la seva similitud estructural amb la molècula de glucosa, la STZ entra dins de les cèl·lules β pancreàtiques a través del transportador de glucosa GLUT2, d'aquesta manera només afecta a aquestes cèl·lules dels illots (Schnedl, 1994). La inducció de la mort de les cèl·lules β per aquest tòxic ve donada per diferents mecanismes: 1) danys a la membrana plasmàtica, 2) trencament de les cadenes de DNA, 3) processos de metilació, 4) generació de radicals lliures, i 5) producció d'òxid nítric (NO). Aquests processos donen lloc a l'activació de l'enzim poly(ADP-ribose) sintasa i al consegüent exhauriment de les reserves cel·lulars de NAD⁺. Això dona lloc a la subseqüent cessació del metabolisme proteic dependent d'aquest metabòlit, i per últim la mort de la cèl·lula (Wilson, 1984). La generació de radicals lliures i productes com el superòxid i l'òxid nítric provocarien també la mort per apoptosi d'aquestes cèl·lules (Bedoya, 1996).

Una única injecció intraperitoneal de STZ a dosis elevades (160-200 mg/kg) a ratolins és suficient per causar la necrosi de les cèl·lules β i l'aparició d'hiperglucèmia al cap d'un o dos dies de la injecció. En canvi, si l'administració es realitza en 5 dosis consecutives de STZ, cada una d'elles de 40 mg/kg, no diabetogèniques de forma individual, es produeix una infiltració limfocitària dels illots pancreàtics (insulitis) que destrueix la cèl·lula β i dóna lloc al desenvolupament de diabetis al cap d'unes setmanes. Aquest mètode d'administració es coneix com a MLD STZ (*Multiple Low Doses of Streptozotocin*) i proporciona un bon model experimental, ja que en aquest cas la mort es dóna per un procés d'apoptosi, més lent, i no per un procés de necrosi com en el model d'administració única (Like & Rossini, 1976).

Cal tenir en compte però, que l'efecte d'aquest tòxic varia segons l'edat, el sexe i la soca de l'animal al que s'administra. La soca CD-1, per exemple, és més susceptible que no pas la soca C57BL/6;SJL, aquesta última desenvolupa diabetis després de l'administració amb MLD STZ, però sense presentar infiltració limfocitària en els seus illots (Rossini, 1977).

Així doncs, tant en la patologia de la diabetis tipus 1, com en la diabetis tipus 2, la combinació dels factors ambientals (dieta infeccions víriques, o estrès en la tipus 1; i obesitat i sedentarisme en la tipus 2), conjuntament amb la predisposició genètica, dóna lloc a l'alteració i mort de les cèl·lules β pancreàtiques. Per tal d'aprofundir però en l'estudi del desenvolupament d'aquestes dues patologies, es fa necessari el coneixement de la funcionalitat de les cèl·lules β pancreàtiques i de les seves possibles alteracions.

5. FACTORS DE CREIXEMENT SIMILARS A LA INSULINA (IGFs).

Els factors de creixement similars a la insulina I i II (IGF-I i l'IGF-II) pertanyen a una família de pèptids relacionats amb la insulina. Tots dos factors de creixement conserven una gran homologia entre ells i amb la insulina. A nivell estructural els dos IGFs són molt similars, ja que en la seva estructura s'hi poden reconèixer els dominis A, B i C, com en la proinsulina. Presenten a més, una extensió en 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, els IGFs circulen a concentracions de l'ordre de nanomolar i units a proteïnes d'unió que modulen la seva activitat (IGFBPs) (Jones, 1995). El principal òrgan productor d'IGFs i de la majoria de les seves proteïnes d'unió és el fetge, tot i que també poden ser sintetitzats en la majoria de teixits a on actuen (Rosen, 1999). La insulina actua principalment en el fetge, múscul i teixit adipós, mentre que els IGFs ho fan pràcticament en tot l'organisme (Kahn, 1985; Daughaday, 1989). Els IGFs presenten doncs una àmplia distribució en molts teixits i són importants reguladors del creixement cel·lular, diferenciació i metabolisme. A nivell cel·lular poden actuar de forma autocrina o paracrina regulant mitosi, mort cel·lular, diferenciació i quimiotaxis (Hawkes, 2004).

Els efectes dels dos IGFs vénen mediatos per la seva unió específica a receptors de membrana. Tant l'IGF-I com l'IGF-II poden unir-se al receptor de la insulina (IR), i a part posseeixen els seus propis receptors amb els qui hi tenen major afinitat (IGF-IR i receptor IGF-II/M6P respectivament) (Hintz, 1972; Morrione, 1977; Zapf, 1978). El receptor de la insulina (IR) i el receptor de l'IGF-I (IGF-IR) formen part d'una família de receptors tirosina quinasa anomenats receptors tipus I. Ambdós tenen una estructura molt similar que consta de quatre subunitats unides per ponts disulfur: 2 subunitats α extracel·lulars, i 2 subunitats β transmembrana amb activitat tirosina quinasa (Massagué, 1982). Aquest receptors de tipus I són els responsables de la majoria de les accions de tipus metabòlic i de control de la proliferació i diferenciació dels IGFs. El receptor IGF-IR té molta afinitat per l'IGF-I i una afinitat unes 10 vegades menor per l'IGF-II, i unes 100 vegades menor per la insulina (Le Roith, 1997).

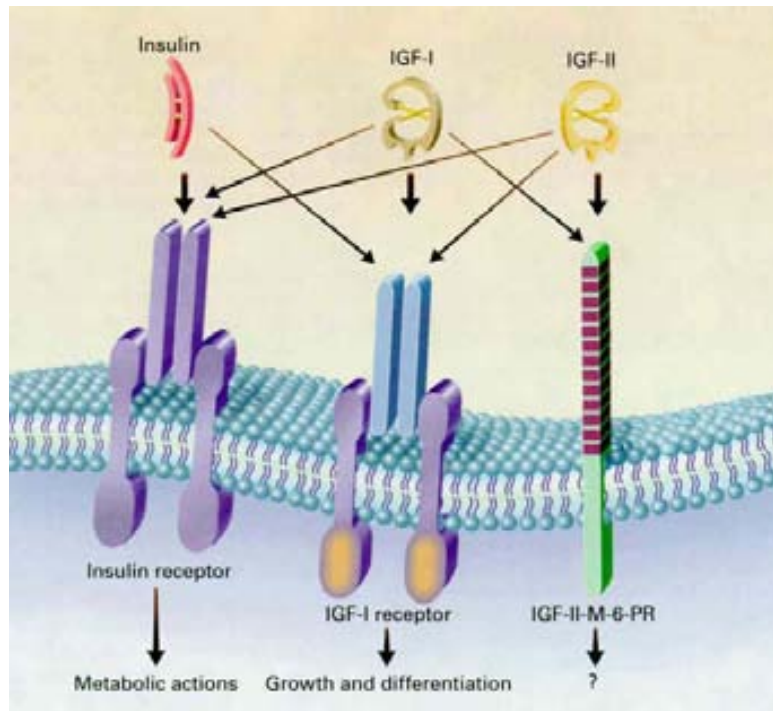
Els receptors de tipus II (IGF-II/M6P), en canvi, són estructuralment molt diferents de l'IR o de l'IGF-IR, és un receptor de tipus glicoproteïna transmembrana i no presenta activitat tirosina quinasa sinó que és un receptor acoblat a proteïna G. Semblen tenir un paper en la internalització i destrucció dels IGFs en els lisosomes, però no semblen estar involucrats en la mediació de les accions pròpies dels IGFs. Tenen una alta afinitat per l'IGF-II, i no uneixen ni IGF-I, ni insulina de forma apreciable.

Les afinitats pels diferents receptors serien doncs les següents (esquema 7):

IR → Insulina > IGF-I > IGF-II

IGF-IR → IGF-I > IGF-II > Insulina

Receptor IGF-II/M6P → IGF-II



Esquema 7. Esquema d'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 de l'IR. En ambdós casos la unió del lligand amb les subunitats α dels receptors indueix un canvi conformacional dels receptors que provoquen l'autofosforil·lació dels residus tirosina quinasa localitzats a la part intracel·lular de les subunitats β dels receptors. Aquesta autofosforil·lació dóna lloc a una cascada de senyalització intracel·lular que inclou la via de senyalització de la MAP quinasa i/o de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) i Akt (Hawkes, 2004). 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 receptors, 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 IGF-IR. Per contra, els fibroblasts i les cèl·lules β del pàncrees contenen principalment IGF-IR (Flier, 1986)

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

S'ha descrit que l'IGF-I té un paper important en el desenvolupament i creixement del pàncrees exocrí i endocrí, i que estimula la diferenciació i proliferació de les cèl·lules β (Le Roith, 1997). Aquesta proliferació induïda per IGF-I es dona sobretot a través de l'activació de IRS-2 (Lingohr, 2002). Durant el desenvolupament embrionari l'IGF-I és produït a nivells molt baixos, per això, es considera que és més important pel creixement i diferenciació del teixit pancreàtic postnatal (Smith, 1991; Hayakawa, 1996; Dupont, 2003). A part, l'IGF-I té també, un efecte antiinflamatori i antiapoptòtic molt potent via els seu receptor (IGF-IR) (Kauffmann-Zeh, 1997; Mabley, 1997; Giannoukakis, 2000).

5.1.1. Animals transgènics que expressen IGF-I a les cèl·lules β pancreàtiques.

En el nostre laboratori s'havien generat ratolins transgènics que expressaven IGF-I específicament a les cèl·lules β pancreàtiques (ratolins RIP-I/IGF-I) (George, 2002). Aquests ratolins presenten nivells circulants d'IGF-I similars als dels animals control, suggerint un efecte paracrí/autocrí de l'IGF-I, i no a nivell sistèmic. Són ratolins normoglicèmics i normoinsulinèmics, i a nivell pancreàtic no presenten alteracions ni en la morfologia ni en la distribució dels illots. L'expressió local d'IGF-I, tant en fons genètic C57BL/6;SJL com CD-1, contraresta la citotoxicitat i la insulinitis provocades pel tractament amb 50 mg/Kg de STZ (George, 2002). Els ratolins control tractats amb aquesta dosi de STZ desenvolupen hiperglicèmia, hipoinsulièmia, perden massa de cèl·lula β i, finalment moren. Els ratolins transgènics RIP/IGF-I, en canvi, mostren una lleugera hiperglicèmia al primer mes després del tractament, però normalitzen gradualment la seva glucèmia i la resta de paràmetres metabòlics i sobreviuen. Paral·lelament a aquesta normalització dels paràmetres sèrics, s'observa una regeneració de la massa de cèl·lula β , com a resultat d'un increment en la neogènesi i la replicació d'aquesta.

Quan els transgènics RIP/IGF-I es creuen amb animals RIP/hINF β , que presenten susceptibilitat a desenvolupar diabetis autoimmune (Alba, 2004; Casellas, 2006), l'expressió d'IGF-I en aquests animals doble transgènics IFN β /IGF-I redueix l'expressió de β 2-microglobulina, bloqueja l'expressió de Fas i contraresta la infiltració present en els illots dels animals RIP/hINF β . El fet de co-expressar IGF-I, protegeix aquests ratolins doble transgènics IFN β /IGF-I del desenvolupament de diabetis tipus 1 (Casellas, 2006). 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 induïda de forma experimental amb STZ, i a part, és capaç també de protegir els illots enfront la infiltració limfocitària i l'apoptosi en un model murí que presenta susceptibilitat a desenvolupar diabetis autoimmune.

5.2. FACTOR DE CREIXEMENT SIMILAR A LA INSULINA-II (IGF-II).

El gen de l'IGF-II es localitza en el cromosoma 11 en els humans i en el cromosoma 7 en els ratolins, pròxim al gen de la insulina en totes dues espècies (Bell, 1985; Frunzio, 1986). El principal òrgan de producció dels dos IGFs és el fetge, es desconeix, però, com es regula la síntesi i secreció hepàtica d'IGF-II. Durant el desenvolupament pancreàtic, l'IGF-II participa en la regulació del creixement i diferenciació dels illots, i és molt més abundant que l'IGF-I (Le Roith, 1997). L'expressió d'IGF-II a nivell pancreàtic s'ha localitzat a nivell de cèl·lules β dels illots, tant en humans com en ratolins (Portela-Gomez, 2000).

En rosegadors, durant el període embrionari l'IGF-II s'expressa a nivells elevats, però, la seva expressió s'extingeix pràcticament en la majoria dels teixits unes dues setmanes després del naixement. En aquestes espècies animals, un cert percentatge de cèl·lules β són eliminades per processos d'apoptosi entre 10 i 14 dies després del naixement, procés considerat important per la organització i remodelació de la massa de cèl·lules β en aquest període neonatal (Scaglia, 1997). Aquesta onada d'apoptosi s'ha descrit que coincideix amb la disminució de l'expressió d'IGF-II en els illots durant les primeres setmanes de vida (Petrik, 1998). De fet, en animals transgènics, en els quals els nivells sèrics d'IGF-II es mantenen després del naixement, no es dona aquesta onada d'apoptosi en les cèl·lules β (Hill, 2000)

En els humans, a diferència dels rosegadors, tant l'IGF-I com l'IGF-II es mantenen en circulació durant tota la vida adulta, especialment l'IGF-II que arriba a assolir nivells en plasma tres vegades superiors als d'IGF-I (Haeften, 2004). Tot i els nivells elevats en plasma trobats en humans, es desconeix el paper fisiològic d'IGF-II després del naixement. No obstant, es creu que probablement l'IGF-II juga un paper molt més important durant el desenvolupament embrionari, que no pas en l'adult. El que sí és conegut, és que, en humans, la seva expressió i presència en sèrum, tant en el fetus com en l'adult, ve regulada, com a mínim, per cinc mecanismes de control negatiu: 1) Bloqueig transcripcional pel gen repressor de tumors Wilm's (WT1), localitzat en el cromosoma 11 igual que el gen d'IGF-II humà (Drummond, 1992); 2) Inactivació de l'al·lel femení per *imprinting*; 3) Eliminació del torrent sanguini a través dels receptors IGF-II/M6P; 4) Presència en plasma de, com a mínim, 6 proteïnes d'unió a IGFs (Rogler, 1994); i 5) La presència a nivell citoplasmàtic de, com a mínim, 3 proteïnes d'unió al RNAm d'IGF-II. Aquestes proteïnes reben el nom d'IMPs o IGF2BPs i regulen la biosíntesi d'IGF-II. IMP2 s'ha descrit que bloqueja la traducció del RNAm d'IGF-II, sobretot a nivell de desenvolupament embrionari (Nielsen, 1999). Molt recentment, s'ha descrit que un dels locus associats al desenvolupament de diabetis tipus 2 es localitza pròxim al gen *IGF2BP2* (Zeggini, 2007; Scott, 2007; Saxena, 2007).

Els efectes d'IGF-II vénen mediatos per la seva unió específica a receptors de membrana. L'IGF-II pot unir-se amb diferent afinitat als següents receptors: receptor de la insulina (IR), receptor d'IGF-I (IGF-IR) i el receptor d'IGF-II (IGF-II/M6P). El receptor d'insulina existeix en dues isoformes (IR-A i IR-B). IR-A és una isoforma més curta generada a partir de l'*splicing* de l'exó 11 (Seino, 1989), és la isoforma predominant en el fetus i uneix IGF-II amb elevada afinitat. La isoforma IR-B, en canvi, predomina en els teixits adults. IGF-II, de fet, s'uneix a IR-A però no a IR-B. Durant el desenvolupament embrionari els efectes d'IGF-II en la regulació del creixement i la diferenciació cel·lular vindrien mediatos en gran part per la senyalització a través d'IR-A (Frasca, 1999; Rother, 2000).

El receptor IGF-II/Manosa-6-fosfat (IGF-II/M6P) presenta una elevada afinitat per IGF-II i no uneix ni insulina ni IGF-I. Es tracta d'un receptor d'expressió ubiqüa en diferents tipus cel·lulars i teixits, els seus nivells d'expressió vénen regulats a nivell de teixit i de desenvolupament. Funciona en dos processos biològics diferents: el transport de lisosomes a nivell intracel·lular i la degradació d'IGF-II mitjançant l'endocitosi (Hawkes, 2004). La participació del receptor IGF-II/M6P en la mediació d'accions biològiques en resposta a la unió amb IGF-II és controvertida. Alguns estudis indiquen que la unió d'IGF-II al receptor IGF-II/M6P pot induir un increment de la captació d'aminoàcids en cèl·lules musculars, augmentar la síntesi de glucogen en hepatòcits i promoure la secreció d'insulina en les cèl·lules β pancreàtiques (Zhang, 1997).

Hi ha estudis que demostren que l'IGF-II a part de tenir importants efectes antiapoptòtics (Hill, 2000), és capaç també d'induir *in vitro* la proliferació i la diferenciació de les cèl·lules β (Rabinovitch, 1982; Hogg, 1993) i està involucrat en la regulació del creixement i diferenciació dels illots (Han, 1988; Le Roith, 1997). Totes aquestes propietats antiapoptòtiques i mitòtiques descrites per l'IGF-II es considera que vénen mediatos, principalment, per la seva interacció amb l'IR-A i l'IGF-IR (Rother, 2000; Haeflén, 2004).

5.2.1. Animals transgènics que sobreexpressen IGF-II a les cèl·lules β pancreàtiques.

Tal i com s'ha descrit anteriorment, en el nostre laboratori s'havien generat ratolins transgènics que sobreexpressen IGF-II específicament en les cèl·lules β pancreàtiques (ratolins RIP/IGF-II). Aquests animals presenten unes característiques fenotípiques pròpies d'una pre-diabetis i unes alteracions morfològiques a nivell dels illots molt similars a les que presenten alguns models animals de diabetis tipus 2 (Devedjian, 2000).

III. OBJECTIUS

Es considera que alteracions en la funcionalitat de les cèl·lules β podrien ser claus en l'inici i progressió de la diabetis mellitus. En el nostre laboratori s'havia demostrat que animals transgènics que sobreexpressen el factor de creixement IGF-II específicament a les cèl·lules β pancreàtiques (RIP/IGF-II) presenten un estat pre-diabètic tipus 2. A més, també s'han descrit diverses alteracions gèniques que confereixen susceptibilitat a desenvolupar diabetis, com ara el *locus IDDM2* i *SNPs* en el gen *IGF2BP2*, que podrien estar associades a variacions en els nivells d'expressió d'IGF-II en cèl·lules β . Així doncs, l'objectiu general d'aquest treball va ser **examinar el paper de la sobreexpressió d'IGF-II en cèl·lules β en l'inici del procés diabètic.**

Es van estudiar aquests animals per tal de determinar les alteracions en la funcionalitat de les cèl·lules β causades per l'expressió d'IGF-II. També es va examinar la susceptibilitat d'aquests ratolins transgènics a desenvolupar diabetis oberta en front estímuls que actuessin com a factors acceleradors.

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

1. Estudiar les alteracions presents en les cèl·lules β dels ratolins transgènics RIP/IGF-II, això involucrava:
 - 1.1. Estudiar els processos de la captació de glucosa i secreció d'insulina en els illots dels ratolins transgènics RIP/IGF-II.
 - 1.2. Estudiar, en els illots dels ratolins transgènics, el perfil d'expressió de gens claus en la funcionalitat de la cèl·lula β .
2. Estudiar el paper de les alteracions de les cèl·lules β dels ratolins transgènics en la susceptibilitat a desenvolupar diabetis oberta en presència d'un factor accelerador.

Estudiar la sensibilitat dels ratolins RIP/IGF-II al tractament amb estreptozotocina.

Estudiar la susceptibilitat dels ratolins RIP/IGF-II a desenvolupar diabetis oberta en front un procés autoimmune, mitjançant el seu creuament amb ratolins RIP/hIFN β .

IV. RESULTATS

1. ESTUDI DELS ILLOTS PANCREÀTICS DELS RATOLINS TRANSGÈNICS RIP/IGF-II.

Ratolins transgènics que sobreexpressen el factor de creixement IGF-II específicament a les a les cèl·lules β pancreàtiques (RIP/IGF-II) presenten unes característiques fenotípiques pròpies d'un estat pre-diabètic (Devedjian, 2000). En aquest treball, es van estudiar les alteracions presents en les cèl·lules β durant l'estadi de pre-diabetis, a fi de determinar la seva contribució en tot aquest procés.

1.1. ESTUDI HISTOLÒGIC DELS ILLOTS DELS RATOLINS TRANSGÈNICS RIP/IGF-II.

Les cèl·lules β , productores d'insulina, estan situades normalment al centre dels illots; les cèl·lules α , productores de glucagó, situades a la perifèria; i distribuïdes entre les cèl·lules α i les β , es troben les cèl·lules δ i PP, que secreten somatostatina i polipèptid pancreàtic, respectivament. Una anàlisi histològica ens va permetre comprovar que, tal i com Devedjian *et al.* havien descrit, en els illots del ratolins transgènics RIP/IGF-II aquesta organització cel·lular està totalment alterada: les cèl·lules α es troben distribuïdes per tot l'illot i no només a la seva perifèria (Fig.1). S'ha descrit que la organització dels diferents tipus cel·lulars dins dels illots és molt important pel correcte funcionament d'aquestes cèl·lules, de fet, alteracions morfològiques molt similars s'han descrit en diversos models animals de diabetis tipus 2 (Tokuyama, 1995; Hoog, 1996; Chankiewicz, 2006).

Insulina / Glucagó

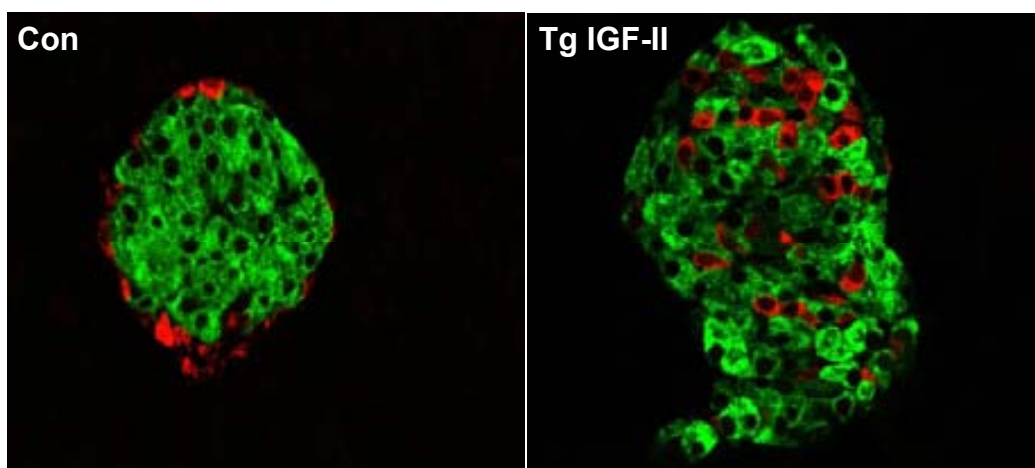


Figura 1. Estudi de l'estructura dels illots pancreàtics dels ratolins transgènics RIP/IGF-II. Imatge d'un illot d'un ratolí control i d'un ratolí transgènic RIP/IGF-II en que es marquen, mitjançant tinció immunohistoquímica, les cèl·lules β , productores d'insulina (verd), i les cèl·lules α , productores de glucagó (vermell). Ampliació x400.

1.2. ESTUDI DE LA CAPACITAT DE SECRECIÓ D'INSULINA EN ELS RATOLINS RIP/IGF-II.

Donat que la funció principal de les cèl·lules β és el control de la glucèmia de l'organisme, mitjançant la biosíntesi i secreció d'insulina en resposta a la sobrecàrrega de glucosa, a continuació, es va estudiar si les alteracions descrites a nivell d'estructura i d'organització en els illots dels ratolins RIP/IGF-II estaven també relacionades amb alteracions en la funcionalitat de les cèl·lules β .

Per tal de comprovar si les cèl·lules β dels ratolins transgènics IGF-II eren capaces de respondre correctament a la sobrecàrrega de glucosa, es va dur a terme un test de tolerància a aquest sucre en ratolins de 2 mesos d'edat. Així, es dejunaren els animals durant 16 hores, posteriorment se'ls determinà la glucèmia basal i se'ls injectà intraperitonealment una dosi de glucosa de 2 g/kg de pes. Es va fer un seguiment de la glucèmia dels animals cada 30 minuts durant tot el test. En cada un dels punts, a part de mesurar la glucèmia se'ls varen extreure 50 μ l de sang per la vena de la cua, per tal d'analitzar la concentració d'insulina. Així, vàrem poder comprovar que als 2 mesos d'edat els ratolins transgènics IGF-II presenten una marcada intolerància a la glucosa (Fig. 2A). Aquesta intolerància era deguda a una disminució en la secreció d'insulina en resposta al sucre (Fig. 2B).

La secreció d'insulina en resposta a la glucosa és bifàsica. El primer pic es dona als pocs minuts de la injecció de glucosa i és deguda a l'exocitosis de la insulina acumulada en els grànuls de secreció. El segon pic correspon ja a la secreció de la insulina sintetitzada *de novo* (Kahn, 2001). Donades les alteracions en el test de tolerància a la glucosa, es va fer un seguiment de la secreció d'insulina en resposta a aquest sucre a temps més curts, per tal de comprovar si en els animals transgènics IGF-II es donaven de forma correcta els dos pics de secreció. Per això, es dejunaren animals de 2 mesos d'edat durant 16 hores. Després del dejuni es va agafar una primera mostra de sang a temps 0 i posteriorment se'ls injectà intraperitonealment una dosi de 3g/Kg de glucosa. A continuació es varen prendre mostres de sang als minuts 2, 5, 15 i 30 després de la injecció per tal de determinar la concentració d'insulina. En el cas dels animals control, s'observà un primer pic de secreció als 2 minuts i un segon als 15 minuts. En els animals transgènics IGF-II, la secreció d'insulina en resposta a la sobrecàrrega de glucosa estava disminuïda, s'observaven els dos pics de secreció, però eren menors (Fig. 2C). La disminució de la secreció d'insulina en resposta a glucosa és característica dels individus en fases inicials de la diabetis tipus 2, fet que ens confirma que els ratolins IGF-II es trobaven en un estat pre-diabètic.

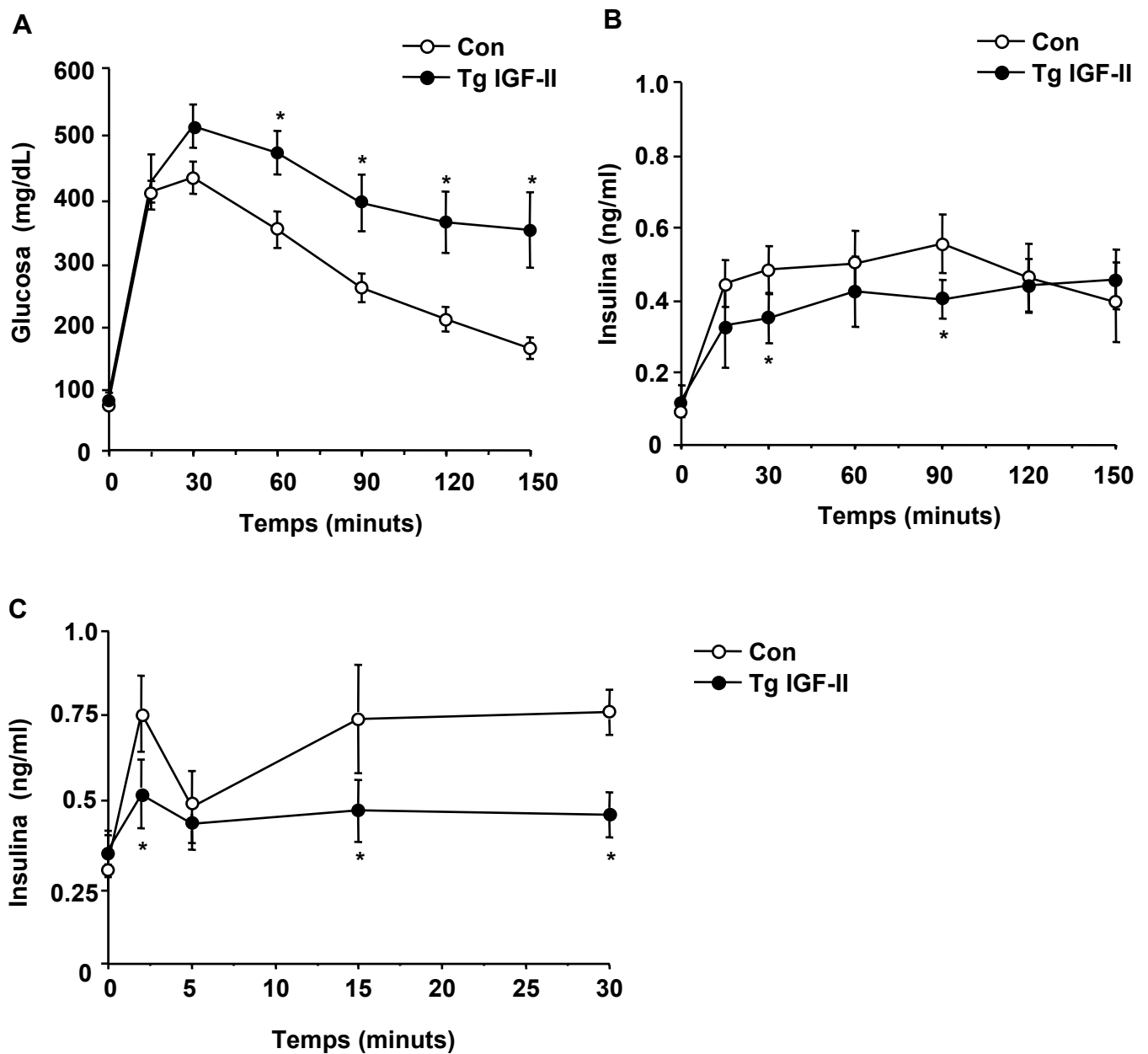


Figura 2. (A) Test de tolerància a la glucosa (GTT). Es va administrar glucosa (2 g/Kg pes) intraperitonealment després de 16 hores de dejuni. El seguiment de la glucèmia es va realitzar cada 30 minuts. Els resultats són la mitja \pm SEM de 8 animals per grup (* ratolins IGF-II vs. controls en aquell mateix punt; * $p < 0.05$). **(B) Secreció d'insulina durant el GTT.** Durant el GTT s'obtingueren mostres de sang de cada animal en cada un dels punts del test. A partir d'aquestes mostres es va mesurar per ELISA la concentració d'insulina al llarg del test. Els resultats són la mitja \pm SEM de 8 animals per grup (* ratolins IGF-II vs. controls en aquell mateix punt; * $p < 0.05$). **(C) Secreció d'insulina *in vivo*.** Es va administrar glucosa (3 g/Kg) intraperitonealment després de 16 hores de dejuni. Es va extreure sang abans de la injecció, i als 2, 5, 15 i 30 minuts després. Els resultats són la mitja \pm SEM de 7 animals per grup (* ratolins IGF-II vs. controls en aquell mateix punt; * $p < 0.05$).

1.3. ESTUDI DELS PROCESSOS DE CAPTACIÓ DE GLUCOSA I SECRECIÓ D'INSULINA EN ELS ILLOTS DELS RATOLINS TRANSGÈNICS RIP/IGF-II.

Per tal de determinar quines podien ser les alteracions responsables de la disminució en la secreció d'insulina en els ratolins IGF-II, vam analitzar l'expressió de proteïnes claus en el procés de captació de glucosa i de secreció d'insulina en aquests animals.

1.3.1. Estudi de les proteïnes implicades en el procés de captació de la glucosa.

Es van determinar els nivells d'expressió del transportador de glucosa Glut2 i l'enzim glucoquinasa. Aquestes dues proteïnes constitueixen l'anomenat sensor de la glucosa per les cèl·lules β , ja que, en gran part, d'elles depèn el flux d'entrada de glucosa a les cèl·lules β i la posterior secreció d'insulina.

En analitzar l'expressió del transportador Glut2 mitjançant PCR a temps real o PCR-quantitativa (*Q-PCR*), s'observà una disminució del 71% de la seva expressió en els illots del ratolins IGF-II respecte la dels ratolins control (Fig. 3A). Aquesta disminució es va confirmar posteriorment mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica del pàncrees d'animals control i transgènics. Aquest estudi va demostrar la gran absència del transportador en les membranes de les cèl·lules β dels ratolins IGF-II (Fig. 3B). També es va analitzar l'expressió del transportador Glut1, per tal de comprovar si la manca d'expressió de Glut2 en els ratolins IGF-II, es veia compensada per l'increment en l'expressió d'un altre transportador de glucosa. No obstant, no s'observaren diferències en els nivells de Glut1 entre els illots de ratolins control i transgènics IGF-II (Fig. 3C).

A continuació es va determinar l'expressió de l'altre membre del sensor de glucosa, l'enzim glucoquinasa. Els nivells d'expressió d'aquest enzim s'analitzaren mitjançant *Q-PCR* i *Western blot*. Els resultats obtinguts per *Q-PCR* semblaven indicar que els illots dels ratolins transgènics IGF-II presentaven uns nivells de l'enzim lleugerament inferiors als dels ratolins control, tot i que no eren diferències estadísticament significatives (Fig. 3D). A nivell de proteïna però, no s'observaren diferències entre els illots control i els IGF-II (Fig. 3E).

Així doncs, la manca de secreció d'insulina observada en els ratolins transgènics IGF-II podia venir donada, almenys en part, per una disminució de la captació de glucosa per part de les cèl·lules β , deguda a la reducció de l'expressió de Glut2.

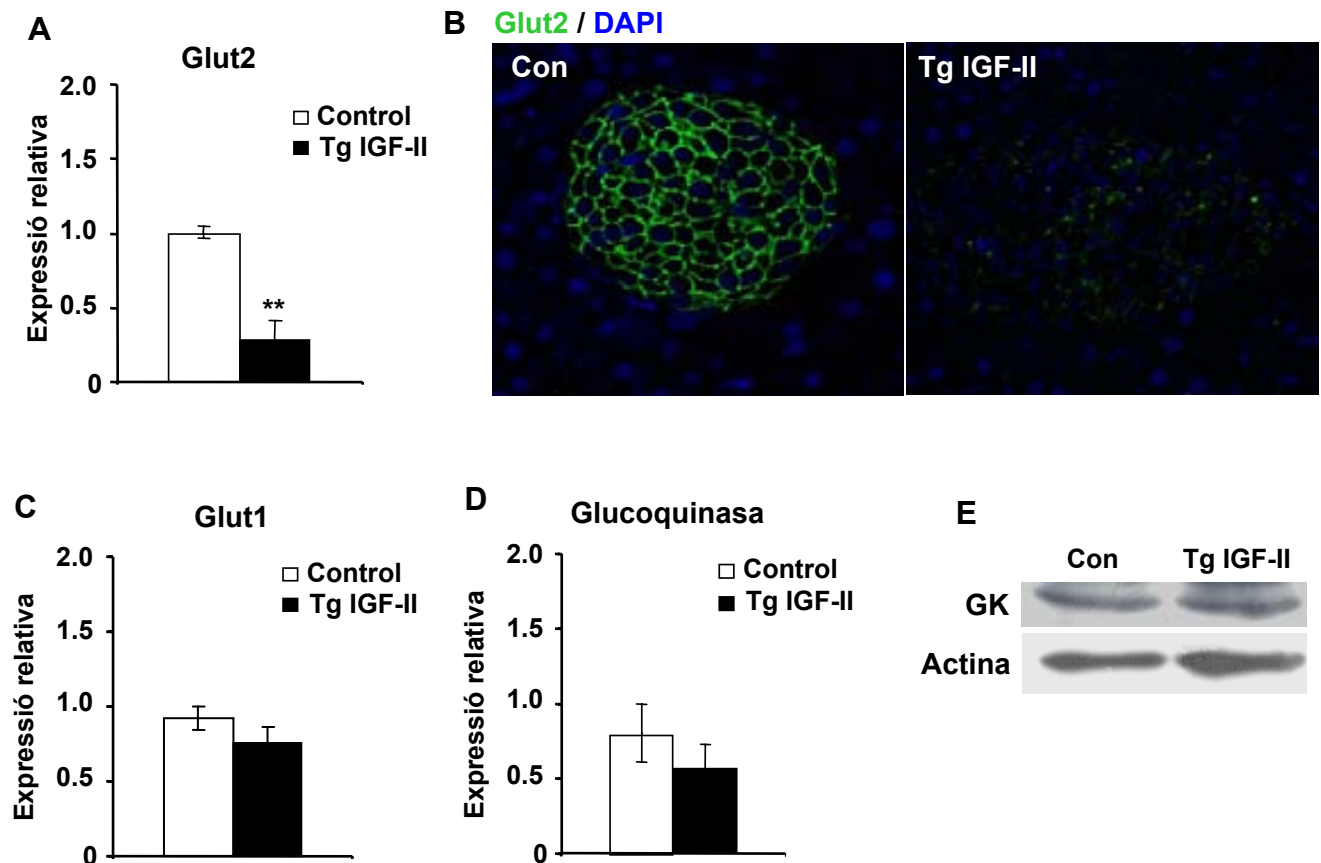


Figura 3. Anàlisi de l'expressió de les proteïnes implicades en la captació de glucosa en les cèl·lules β . (A) Anàlisi de l'expressió de Glut2. Es determinaren els nivells d'expressió de Glut2 mitjançant PCR quantitativa a partir d'extractes de RNA d'illots de ratolins control i IGF-II de dos mesos d'edat, tal i com s'indica a l'apartat de Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja \pm SEM de 4 experiments independents (** $p < 0.01$). (B) Anàlisi immunohistoquímica de l'expressió de Glut2. Es van fer talls histològics de pàncrees de ratolins mascles de 2 mesos d'edat, controls i transgènics IGF-II, i es van incubar amb anticossos anti-Glut2, tal i com es descriu en l'apartat de Materials i Mètodes. Ampliació x400. (C, D) Anàlisi de l'expressió d'altres gens relacionats amb la captació de glucosa. Es determinaren els nivells d'expressió de Glut1 (C) i Glucoquinasa (D) mitjançant PCR quantitativa a partir d'extractes de RNA d'illots d'animals control i transgènics IGF-II de dos mesos d'edat, tal i com s'indica a l'apartat de Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja \pm SEM de 4 experiments independents. (E) Expressió de glucoquinasa (GK). Es van determinar els nivells d'expressió de GK mitjançant Western Blot, a partir d'extractes de proteïnes d'illots d'animals control i transgènics IGF-II, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els nivells de proteïna es normalitzaren mitjançant l'expressió d'actina. La GK corresponia a una banda de 52KDa, i l'actina a una de 42KDa.

1.3.1.1. Anàlisi de l'expressió de Glut2 en illots de ratolins transgènics IGF-II neonats.

S'ha descrit que nivells elevats de glucosa en sang poden inhibir l'expressió de Glut2 (Thorens, 1992; Chen, 1992). Donat el fet que els animals transgènics IGF-II presenten una lleugera hiperglucèmia (Devedjian, 2000), es va examinar si la disminució en l'expressió de Glut2, observada en els ratolins IGF-II de dos mesos d'edat, era prèvia o bé posterior a les alteracions descrites en aquests animals. És a dir, si la disminució de Glut2 podria ser causa o bé, conseqüència d'aquestes alteracions. Per això, es varen realitzar anàlisis immunohistoquímiques de pàncrees de ratolins control i transgènics recent nascuts. Es va observar que tant la disminució de Glut2, com les alteracions en l'organització de les cèl·lules dins dels illots, eren ja presents en els ratolins transgènics IGF-II en el moment del naixement (Fig. 4).

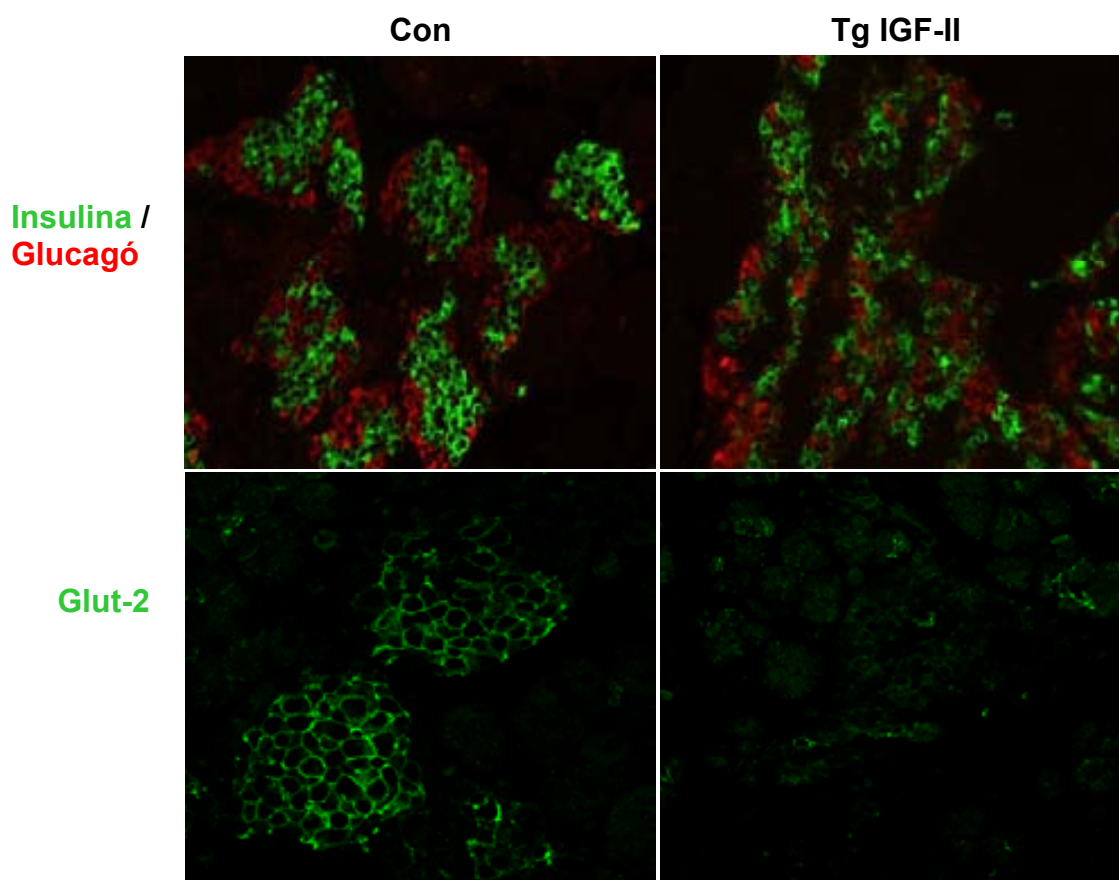


Figura 4. Anàlisi histològiques del pàncrees de ratolins control i transgènic RIP/IGF-II neonats. Es van fer talls histològics de pàncrees procedents de ratolins mascles controls i transgènics IGF-II d'un dia de vida. Es van incubar amb anticossos anti-insulina (verd), anti-glucagó (vermell) i anti-Glut2 (verd), tal i com es descriu en l'apartat de Materials i Mètodes. Ampliació x100 en el cas de Insulina/Glucagó i x400 pel cas de Glut2.

1.3.2. Estudi de gens implicats en el procés de secreció d'insulina.

Donat que les cèl·lules β dels ratolins transgènics IGF-II presentaven una alteració en les proteïnes encarregades de la captació de glucosa, a continuació es va estudiar si presentaven també alteracions en l'expressió d'algun dels gens que codifiquen per proteïnes implicades en el procés de secreció de la insulina. Es mesuraren els nivells d'expressió de les proteïnes Kir6.2 i SUR1, que formen els canals de potassi dependents d'ATP. Està descrit que l'alteració en l'expressió d'aquestes dues proteïnes dona lloc a alteracions importants en la secreció d'insulina. En illots dels ratolins transgènics s'observava una tendència a expressar menys nivells de Kir6.2 i SUR1, però les diferències respecte els illots control no resultaven ser significatives (Fig. 5A i 5B).

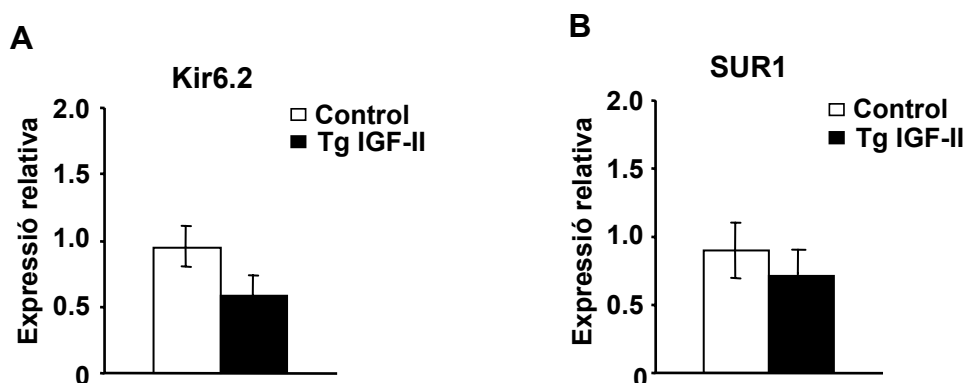


Figura 5. Anàlisi de l'expressió de gens relacionats amb la secreció d'insulina. Es determinaren els nivells d'expressió de les proteïnes que formen els canals de potassi dependents d'ATP, Kir6.2 (A) i SUR1 (B). L'obtenció del RNA d'illots i el posterior anàlisi per Q-PCR es va realitzar tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja \pm SEM de 4 experiments independents.

Aquests resultats semblaven indicar doncs, que l'expressió d'IGF-II en les cèl·lules β d'aquests ratolins transgènics donava lloc a una important disminució de l'expressió de Glut2, però que no alterava significativament els nivells de les proteïnes Kir6.2 i SUR1. Aquesta podria ser per tant una possible causa de la intolerància a la glucosa i disminució en la secreció d'insulina, observades en aquests ratolins transgènics. A continuació, vàrem investigar els mecanismes pels quals es donaven aquestes alteracions en les cèl·lules β d'aquests animals transgènics.

1.4. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA DELS ILLOTS DELS RATOLINS IGF-II.

Per tal d'aprofundir en el coneixement de les alteracions de les cèl·lules β dels ratolins transgènics IGF-II, es va realitzar un estudi comparatiu mitjançant la tecnologia de *microarrays* de DNA. Aquest estudi d'expressió gènica ens permetria trobar els possibles mecanismes que donen lloc a les alteracions en la secreció d'insulina, així com altres alteracions implicades en el desenvolupament de l'estat pre-diabètic en aquests animals.

Un cop analitzades les dades dels *microarrays*, comparant l'expressió en les mostres dels illots dels ratolins control amb les dels ratolins transgènics IGF-II, es trobaren un total de 544 gens alterats de forma estadísticament significativa. D'aquests gens, 69 era per un increment de la seva expressió, i els 475 restants era per una disminució. Segons la classificació del *Gene Ontology* (GO) (www.geneontology.org) la majoria dels gens que presentaven un increment en la seva expressió eren components de la matriu extracel·lular, molècules d'adhesió, inflamació i resposta immune. Segons aquesta mateixa classificació en el grup de gens que presentaven una disminució en l'expressió hi havia principalment gens relacionats amb el metabolisme cel·lular: factors de transcripció, cadena de transport d'electrons, transport i cicle cel·lular.

De tot el conjunt de gens obtinguts, es van escollir aquells que:

- 1) estaven relacionats amb el metabolisme de les cèl·lules β i les funcions de captació de glucosa i secreció d'insulina.
- 2) podien estar relacionats amb les alteracions morfològiques descrites en els illots dels ratolins transgènics IGF-II.
- 3) estaven relacionats amb el sistema immunitari, i per tant, podrien contribuir també amb les alteracions de l'estat pre-diabètic.

1.4.1. Estudi dels gens relacionats amb el metabolisme de les cèl·lules β i les funcions de captació de glucosa i secreció d'insulina.

Dins del grup de gens implicats en el funcionament de les cèl·lules β es va detectar principalment l'alteració de diversos transportadors de membrana, elements de la cadena de transport d'electrons, molècules implicades en el metabolisme cel·lular, i diversos factors de transcripció, entre altres (Taula 1).

En general s'observava una disminució important de gens involucrats en el transport a la membrana. Els tres primers gens de la taula corresponen a transportadors de carbohidrats, entre els quals es va poder confirmar la marcada disminució del transportador de glucosa *Glut2* (ombregat amb groc a la Taula 1). Els altres 4 gens corresponen a elements de transport d'ions, com per exemple fosfats, clor, bicarbonat (HCO_3^-) o potassi.

Es detectava també una disminució en l'expressió d'alguns gens implicats en la cadena de transport d'electrons. La producció d'ATP mitjançant aquesta cadena mitocondrial és important, ja que les variacions dels nivells d'ATP regulen múltiples processos cel·lulars, inclosa la secreció d'insulina. Així doncs, alteracions en els processos de producció d'ATP podrien influir també en la disminució de la secreció d'insulina observada en els ratolins transgènics IGF-II.

En el bloc de gens implicats en la transducció de senyals hi trobàvem en primer lloc un receptor, *Angiotensin receptor like*, s'ha descrit que la unió d'aquest amb el seu lligand inhibeix la secreció d'insulina (Sorhede, 2005). El següent gen, *Phospholipase C epsilon1*, és un enzim que forma part del metabolisme de l'inositol-trifosfat (IP_3), important també en la via de senyalització de la insulina. I, els tres darrers gens d'aquest bloc corresponen a enzims implicats en múltiples cascades de senyalització intracel·lular, com per exemple la via de les MAPK i la via d'AKT.

Es detectava també una disminució important del factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF), aquest és essencial per la vascularització i correcta funció dels illots pancreàtics

(Brissova, 2006). Es va confirmar també la sobreexpressió d'IGF-II induïda pel transgèn (ombregat amb groc en la Taula 1).

Dins del grup de gens considerats d'unió a DNA es detectava una marcada disminució de tres factors de transcripció molt importants pel desenvolupament embrionari dels illots i per la funcionalitat de les cèl·lules β : Isl1, Pdx1 i FoxA2 (també anomenat HNF3 β). Els dos últims (ombrejats amb groc en la Taula 1) regulen directament l'expressió de gens implicats en els processos de captació de glucosa i secreció d'insulina. És per això, que ens vam centrar en l'anàlisi d'aquests dos factors de transcripció per tal de continuar els estudis de funcionalitat de les cèl·lules β dels ratolins RIP/IGF-II.

	Símbol	Nom del gen	Gen ID	Variació
Transportadors	Slc35a3	solute carrier family 35 ((UDP-GlcNAc transporter), member 3	229782	0.66
	Slc2a2	solute carrier family 2 (facilitated glucose transp.), member 2 (Glut2)	20526	0.24
	Slc2a5	solute carrier family 2 (facilitated glucose transp.), member 5 (Glut5)	56485	0.61
	Slc20a2	Solute carrier family 20, member 2	20516	0.60
	Scl12a7	solute carrier family 12, member 7	20499	0.57
	Slc4a7	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7	218756	0.47
	Kcnk16	potassium channel, subfamily K, member 16	74571	0,52
Cadena transp. electrons	Atp6v1b2	ATPase, H ⁺ transporting, V1 subunit B, isoform 2	11966	0.77
	Atp6v0c	ATPase, H ⁺ transporting, V0 subunit C	11984	0.61
	Cyp4v3	cytochrome P450, family 4, subfamily v, polypeptide 3	102294	0.53
Transducció de senyals	agtr1	Angiotensin receptor like	23796	4
	Plce1	phospholipase C, epsilon 1	18596	2.5
	Pdgfrb	platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	18596	3
	Prkcm	protein kinase C, mu	18760	0.62
	Prkar1b	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type I beta	19085	0.60
Factors de creixement	Vegfa	vascular endothelial growth factor A	22339	0.53
	Igf2	Insulin like growth factor 2	16002	1361.82
Unió a DNA	Isl1	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain (islet 1)	16392	0.42
	Pdx1	insulin promoter factor 1, homeodomain transcription factor	18609	0.58
	Foxa2	forkhead box A2	15376	0.58

Taula 1. Llistat de gens relacionats amb la funcionalitat de les cèl·lules β . En la taula s'hi mostra l'increment o la disminució d'alguns dels gens relacionats amb la funcionalitat de les cèl·lules β , trobats en l'estudi de *microarrays*. Els gens ombrejats amb groc són resultats que s'havien observat prèviament (la disminució de Glut2 i la sobreexpressió d'IGF2); i gens que s'escolliren posteriorment per seguir l'estudi de funcionalitat dels illots dels ratolins RIP/IGF-II.

1.4.1.1. Estudi de l'expressió de gens regulats per Pdx1 i HNF3 β en les cèl·lules β .

El factor de transcripció Pdx1 és un dels principals factors de transcripció tant durant el desenvolupament embrionari del pàncrees, com en les cèl·lules β adultes. Actua regulant la transcripció de múltiples gens, entre els quals hi ha el gen del transportador de glucosa Glut2 (Waeber, 1996) i el de la glucoquinasa (Watada,1996b). En primer lloc, es va confirmar, mitjançant Q-PCR, la disminució de l'expressió de Pdx1 i HNF3 β en els illots dels ratolins transgènics IGF-II (Fig. 6A i 6B).

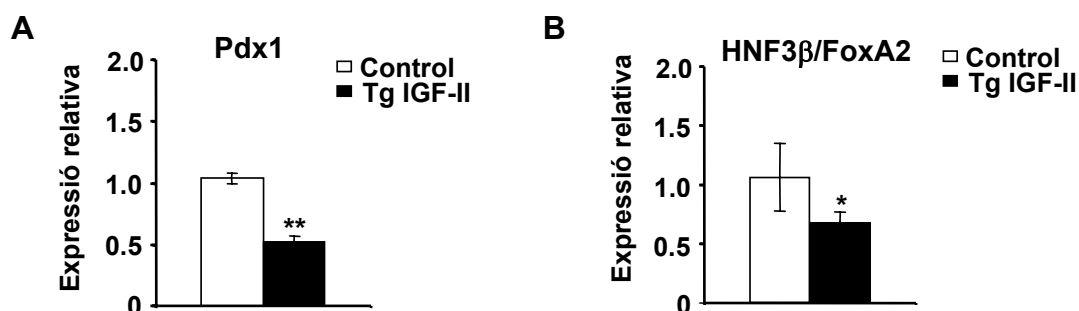


Figura 6. Expressió de Pdx1 i HNF3 β /FoxA2 en illots d'animals de 2 mesos d'edat. Els nivells d'expressió de Pdx1(A), i HNF3 β (B) es determinaren per PCR quantitativa a partir d'extractes de RNA de *pools* d'illots d'animals control i transgènics IGF-II de dos mesos d'edat, realitzat tal i com s'indica a l'apartat de Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja \pm SEM de 4 experiments independents (* p <0.05; ** p <0.01).

La disminució de Pdx1 podria explicar doncs, la important reducció dels nivells de Glut2 observada en els ratolins IGF-II (tal i com s'indica en la figura 7). El factor de transcripció HNF3 β (FoxA2), està descrit que indueix l'expressió de diferents factors de transcripció, com per exemple Pdx1 (Wu, 1997; Lee, 2002), i de les subunitats Kir6.2 i SUR1 dels canals de potassi dependents d'ATP (Sund, 2001; Lantz, 2004). Així doncs la disminució de l'expressió d'HNF3 β podria explicar, en primer lloc, la disminució de l'expressió de Pdx1, i en segon lloc, les petites variacions en l'expressió de les subunitats Kir6.2 i SUR1, observades també en els ratolins IGF-II (Fig. 7).

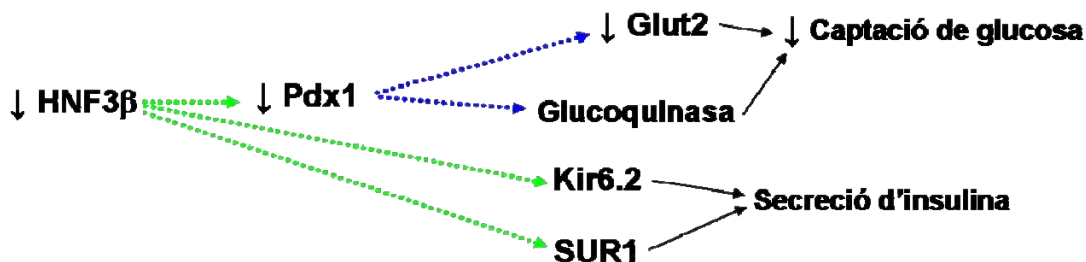


Figura 7. Funcions de Pdx1 i HNF3 β en la regulació de la transcripció de gens implicats en el procés de captació de glucosa i síntesi d'insulina. L'esquema mostra alguna de les funcions d'HNF3 β i Pdx1 en la regulació de gens importants per la captació de glucosa i la secreció d'insulina. Les fletxes (↓) indiquen disminució de l'expressió d'aquests gens. En puntejat es mostren aquelles interaccions, que en el cas dels ratolins transgènics RIP/IGF-II, possiblement es veurien disminuïdes degut a la reducció dels nivells d'expressió d'aquests factors.

Tant Pdx1 com HNF3 β regulen també la transcripció de molts altres gens importants per la funcionalitat de les cèl·lules β . Així doncs, es va examinar, mitjançant Q-PCRs, si la disminució dels nivells d'expressió de Pdx1 i HNF3 β podia induir l'alteració de l'expressió gènica d'altres factors de transcripció importants també en cèl·lules β dels ratolins transgènics.

Pdx1 és un dels principals factors que regulen la transcripció del gen de la insulina. Es van analitzar els nivells d'expressió d'insulina en els illots dels animals control i IGF-II i es va observar una disminució del 54% de l'expressió d'insulina en els ratolins IGF-II (Fig. 8A). L'expressió de Pdx1 ve regulada a la vegada per diferents factors de transcripció com ara HNF3 β i Beta2/NeuroD1, entre altres. Aquest darrer regula tant l'expressió de Pdx1 com la d'insulina (Fig. 9). Els illots dels ratolins IGF-II presentaven una disminució d'un 42% dels nivells de Beta2/NeuroD1, tot i que aquesta no era estadísticament significativa (Fig.8B).

HNF3 β regula, a part de l'expressió de Pdx1, la d'altres factors de transcripció com són HNF4 α , HNF1 α , Nkx6.1 i MafA. Així s'observà que, només els nivells d'expressió d'HNF4 α i MafA es trobaven també significativament disminuïts en els ratolins IGF-II respecte els ratolins control. La reducció d'HNF4 α era d'un 65% (Fig. 8C), i la de MafA era d'un 62% (Fig. 8D). No s'observaren alteracions en els nivells d'expressió de HNF1 α i Nkx6.1 (Fig. 8E i 8F).

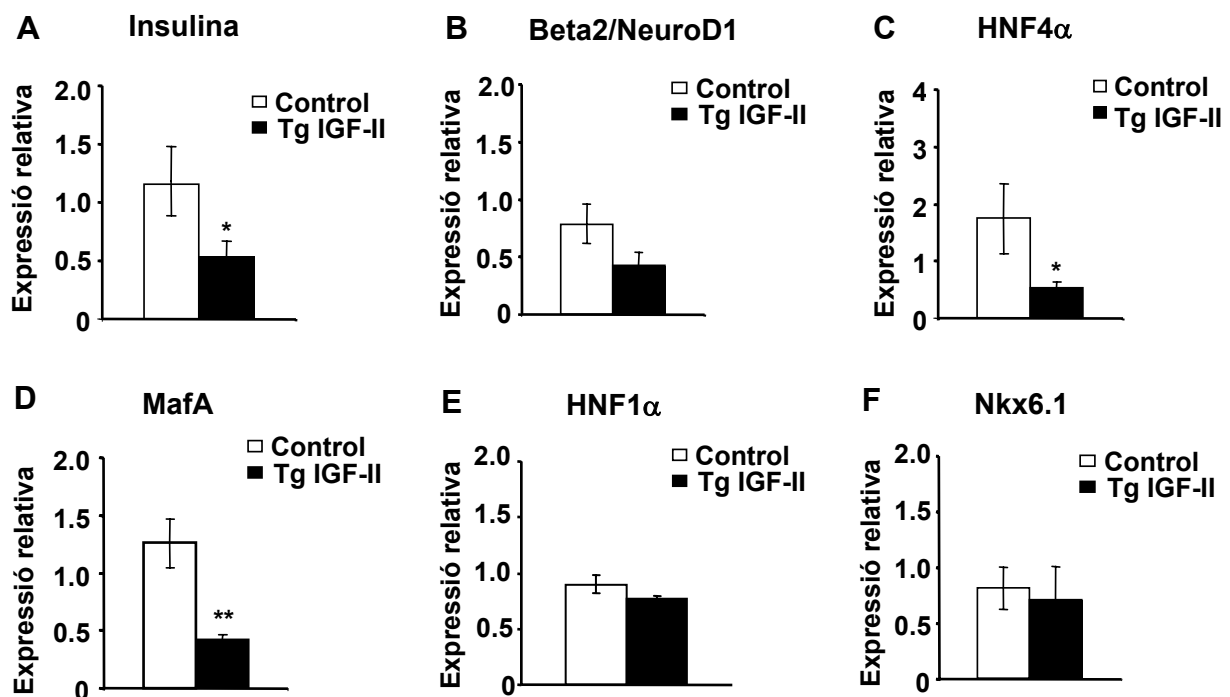


Figura 8. Expressió gènica d'insulina i de factors de transcripció regulats per Pdx1 i HNF3 β . Es determinaren mitjançant Q-PCR, tal i com s'indica a Materials i Mètodes, els nivells d'expressió d'insulina (A) i de factors de transcripció relacionats amb la funcionalitat de les cèl·lules β : Beta2/NeuroD1 (B), HNF4 α (C), MafA (D), HNF1 α (E) i Nkx6.1 (F). Els resultats són la mitja \pm SEM de 4 experiments independents (* p <0.05; ** p <0.01).

Així doncs, l'expressió d'IGF-II en les cèl·lules β d'aquests animals transgènics induïa l'alteració de diversos factors de transcripció importants pel correcte funcionament de les cèl·lules β , tal i com s'esquematitza en les figures 7 i 9. Algunes d'aquests podrien donar lloc a la disminució de *Glut2*, de l'expressió d'insulina i a la corresponent disminució en la secreció d'insulina i intolerància a la glucosa. Alteracions similars s'han descrit en diversos models animals de diabetis tipus 2.

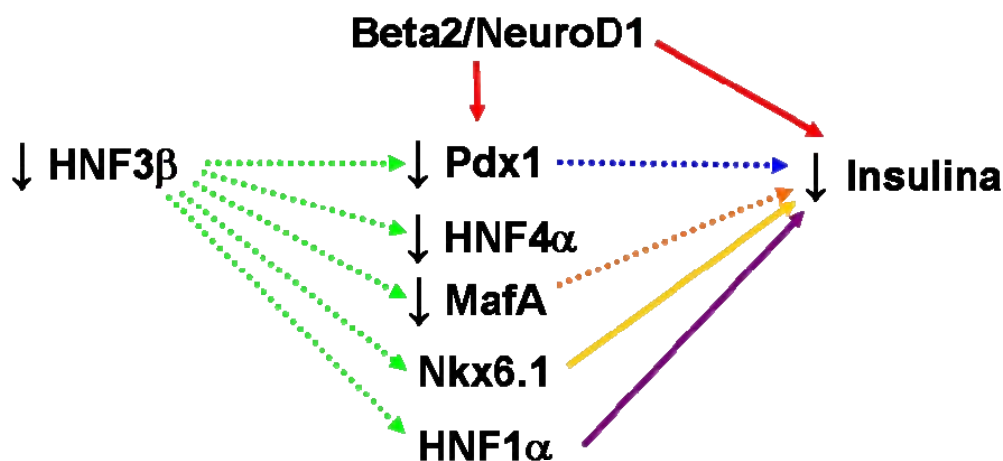


Figura 9. Algunes de les interaccions donades en les cèl·lules β pancreàtiques. L'esquema mostra alguna de les interaccions descrites entre HNF3 β , Pdx1 i altres factors de transcripció importants pel funcionament de les cèl·lules β . Les fletxes (\downarrow) indiquen disminució de l'expressió d'aquests gens en els illots dels ratolins IGF-II. En puntejat es mostren aquelles interaccions, que en el cas dels ratolins transgènics RIP/IGF-II, possiblement es veurien disminuïdes degut a la reducció dels nivells d'expressió d'aquests factors.

1.4.2. Estudi dels gens relacionats amb les alteracions morfològiques dels illots.

En els estudis comparatius mitjançant *microarrays*, alguns dels gens que presentaven un increment important en els illots dels ratolins IGF-II estaven involucrats en l'estructura de la matriu extracel·lular i l'adhesió entre cèl·lules (Taula 2). Alteracions en alguns d'aquests gens podrien estar implicades en la desorganització dels illots, en la majoria dels casos però, podrien tractar-se també d'alteracions donades com a conseqüència d'aquesta desestructuració.

La majoria dels gens que presentaven un increment important en els illots dels ratolins IGF-II eren components implicats en la formació de la matriu extracel·lular, migració i adhesió cel·lular, concretament l'adhesió cèl·lula-matriu. Un exemple d'aquests són tota la família de procol·lagens, el *syndecan 4*, el *nidogen-1*, el *tensin*, el *dermatopontin*, i l'*scavenger receptor class F*. En canvi, es detectava una disminució important dels gens involucrats en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula, com per exemple la caherina 8 (Taula 2).

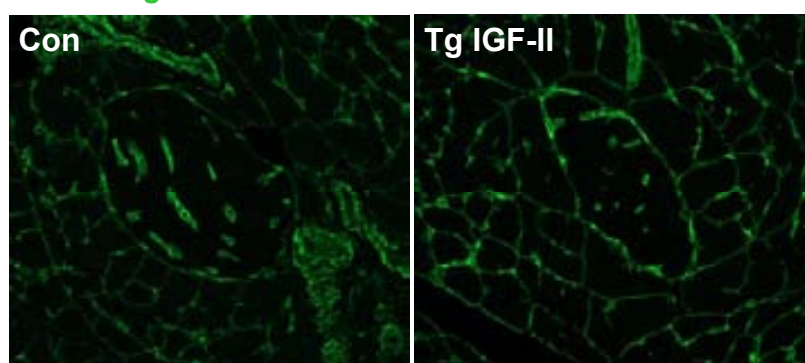
	Símbol	Nom del gen	Gen ID	Variació
Matriu	Sdc4	syndecan 4	20971	2.26
extracel·lular	Col3a1	procollagen, type III, alpha 1	12825	5.37
	Col6a2	procollagen, type VI, alpha 2	12834	4.72
	Col1a2	procollagen, type I, alpha 2	12843	5.39
	Col14a1	procollagen, type XIV, alpha 1	12818	6.97
	Col4a2	procollagen, type IV, alpha 2	12827	1.78
	Nid1	nidogen 1	18073	2.12
	Tns	tensin	21961	2.13
	Dpt	dermatopontin	56429	6.8
	Scarf2	scavenger receptor class F, member 2	224024	2.58
	Cdh8	cadherin 8	12564	0,46

Taula 2. Llistat de gens relacionats amb l'estructura de la matriu extracel·lular. En la taula s'hi mostra l'increment o la disminució d'alguns dels gens relacionats amb la matriu extracel·lulars, trobats en l'estudi de *microarrays* dels illots de ratolins control vs. els illots de ratolins transgènics IGF-II.

Donat que s'observaven moltes alteracions a nivell de l'expressió de pro-col·lagens, es va analitzar l'expressió de col·lagen IV mitjançant una anàlisi immunohistoquímica. No obstant, no s'observaren diferències en els nivells d'expressió i distribució de col·lagen IV entre els illots dels ratolins control i IGF-II (Fig. 10A).

S'ha descrit que les unions cèl·lula-cèl·lula són bàsiques tant pel manteniment de l'organització dels illots, com per la funcionalitat d'aquestes cèl·lules. La E-cadherina és una de les molècules important pel manteniment d'aquesta adhesió entre les diferents cèl·lules de l'illot. (Dahl, 1996). En els illots dels ratolins transgènics IGF-II s'observà també una disminució important dels nivells d'aquesta proteïna (Fig. 10B).

A Col·lagen IV



B

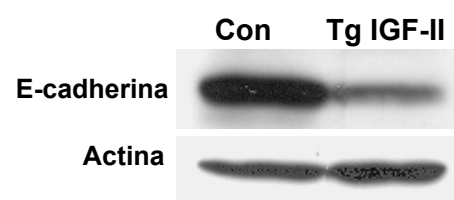


Figura 10. (A) Anàlisi immunohistoquímica de col·lagen IV. Imatge d'un illots d'un ratolí control i d'un ratolí transgènic RIP/IGF-II en que es marca, mitjançant tinció immunohistoquímica, l'expressió de col·lagen IV. Ampliació x200. **(B) Anàlisi de l'expressió de E-cadherina.** Es van determinar els nivells d'expressió d'E-cadherina mitjançant Western Blot, a partir d'extractes de proteïnes d'illots d'animals control i transgènics IGF-II, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els nivells de proteïna es normalitzaren mitjançant l'expressió d'actina. L'E-cadherina corresponia a una banda de 124KDa, i l'actina a una de 42KDa.

1.4.3. Estudi de l'alteració de gens relacionats amb els sistema immunitari.

En els resultats obtinguts dels *microarrays* de DNA, i, segons a classificació del *Gene Ontology*, alguns dels gens que es trobaven sobreexpressats en els illots dels ratolins transgènics IGF-II, eren gens relacionats amb inflamació i resposta immune. Un d'aquests gens era el *H2-Aa*, que codifica per la cadena α del MHC de classe II. L'expressió de MHC de classe II es restringeix normalment a les cèl·lules presentadores d'antígens (APC) del sistema immunitari, com poden ser macròfags, cèl·lules dendrítiques, limfòcits B i limfòcits T. Són reconegudes per les cèl·lules T CD4⁺ i donen lloc a la seva posterior activació (Abbas, 1995).

	Símbol	Nom del gen	Gen ID	Variació
Resposta Immune	H2-Aa	Histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	14960	2.7

Taula 3. Increment de l'expressió del gen H2-Aa. En la taula s'hi mostra l'increment d'alguns dels gens relacionats amb el sistema immunitari, trobats en l'estudi de *microarrays* dels illots de ratolins control vs. IGF-II.

La sobreexpressió d'aquestes de molècules en els illots dels animals transgènics IGF-II resultava ser d'enorme interès, sobretot tenint en compte que els ratolins IGF-II es troben en un fons genètic C57BL/6;SLJ, resistent a desenvolupar infiltració limfocitària. Per tant, donat que aquests illots no presentaven insulitis (Fig. 11), l'increment en l'expressió d'aquests molècules no podia explicar-se per un increment de la presència de cèl·lules dels sistema immunitari.

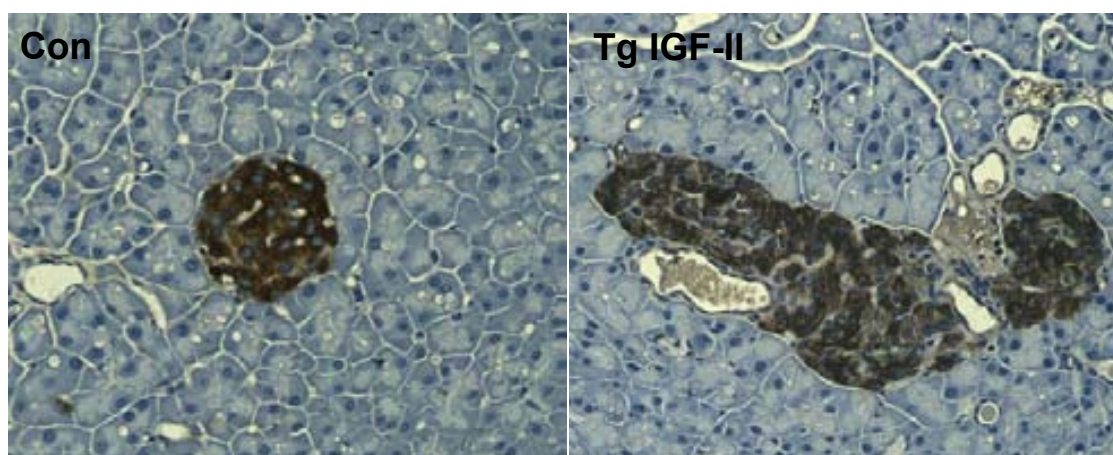


Figura 11. Anàlisi immunohistoquímica del pàncrees dels ratolins IGF-II. Anàlisi immunohistoquímica per detectar l'expressió d'insulina en els illots pancreàtics de ratolins control i transgènics IGF-II. Tinció amb un anticòs anti-insulina (marró), contrastat amb hematoxilina. Ampliació x400.

En primer lloc, es va comprovar el resultat dels *microarrays* mitjançant *Q-PCR* i es va observar que els illots dels ratolins transgènics IGF-II presentaven una expressió de MHC de classe II, sis vegades superior a la dels ratolins control (Fig. 12A). Així doncs, la sobreexpressió d'IGF-II en les cèl·lules β d'aquests ratolins transgènics donava lloc a l'expressió de marcadors propis de cèl·lules presentadores d'antígens. L'expressió de MHC-II a nivell de cèl·lules β s'ha descrit en algun model animal de diabetis tipus 2 (Homo-Delarche, 2006) i en pacients diabètics tipus 1 (Bottazzo, 1985; Foulis, 1987).

Donat l'increment de l'expressió de MHC-II en els illots dels ratolins transgènics, es va examinar si aquest era degut a un increment també de l'expressió gènica del seu coactivador, el transactivador CIITApIV. No obstant, no s'observaren diferències en l'expressió d'aquest transactivador entre els illots dels ratolins control i IGF-II (Fig. 12B).

A continuació s'estudià si en aquestes cèl·lules β també s'hi induïen canvis en els nivells d'expressió de molècules MHC de classe I. Aquestes s'expressen en totes les cèl·lules nucleades de l'organisme i són reconegudes pels receptors TCR de les cèl·lules T CD8⁺ citotòxiques. Per tal de valorar els nivells d'expressió d'aquestes molècules es van determinar mitjançant *Q-PCR* els nivells d'expressió d'una de les cadenes que les constitueixen, la molècula β_2 -microglobulina. En els illots dels ratolins transgènics s'observà un increment significatiu, d'unes dues vegades, dels nivells d'expressió de β_2 -microglobulina (Fig. 12C).

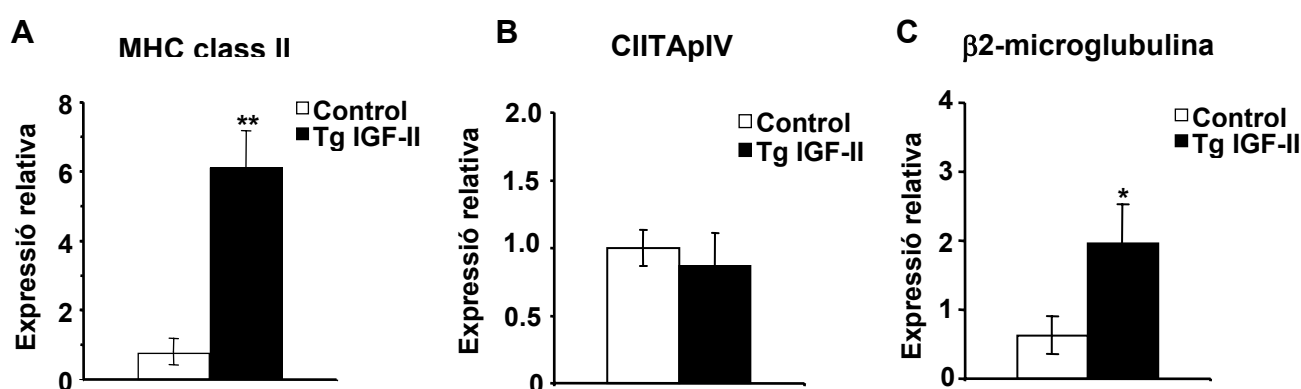


Figura 12. Anàlisi per PCR quantitativa de l'alteració de l'expressió de diferents gens implicats en els sistema immune. Es determinaren els nivells d'expressió de MHC de classe II (A), del transactivador CIITApIV (B) i de β_2 -microglobulina (C), en *pools* d'illots de ratolins control i de ratolins transgènics IGF-II de 2 mesos d'edat. L'obtenció del RNA d'illots i el posterior anàlisi per *Q-PCR* es va realitzar tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja \pm SEM de 3 experiments independents (* p <0.05; ** p <0.01).

1.4.3.1. Estudi dels nivells d'expressió d'insulina i d'IGF-II a timus.

L'expressió del gen quimèric en els ratolins transgènics IGF-II es dona sota el control del promotor del gen de la insulina-1 de rata (RIP-I). S'ha descrit que aquest promotor només s'expressa a nivell de pàncrees i de retina, a diferència del promotor RIP-II que s'expressa a nivell de pàncrees, fetge i timus (Deltour, 1993; Budd, 1993). De totes maneres però, es va comprovar que les alteracions observades a nivell de la hiperexpressió de molècules de MHC de classe I i II no eren degudes a una expressió aberrant del gen quimèric a nivell de timus. Per aquest motiu es van determinar tant els nivells d'expressió d'IGF-II com els d'insulina, mitjançant *Q-PCR*, a mostres de timus de ratolins control i transgènics. No s'observaren diferències entre els dos grups en l'expressió de cap dels dos gens (Fig. 13A i 13B). Per tant, les alteracions observades en els ratolins transgènics eren degudes a l'efecte local de l'expressió del transgen a nivell de les cèl·lules β pancreàtiques, i no a l'efecte de l'expressió del transgen a nivell de timus.

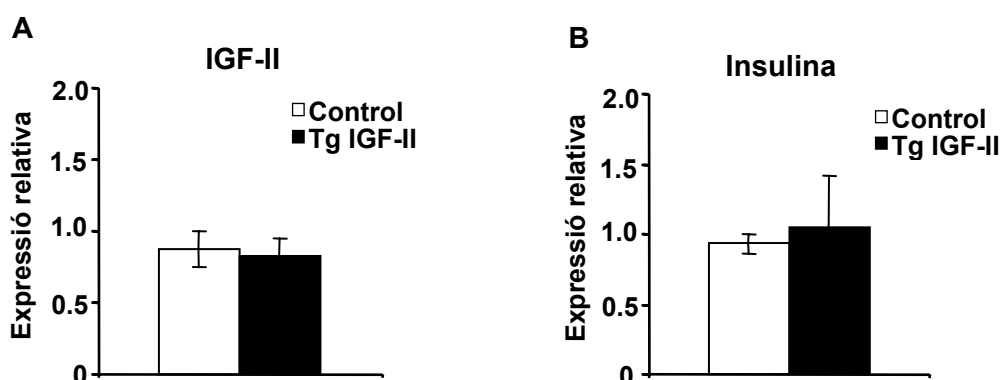


Figura 13. Nivells d'expressió tímica d'insulina i d'IGF-II. L'expressió d'insulina i d'IGF-II es determinà per *Q-PCR* de timus de ratolins control i IGF-II de 2 mesos d'edat. Els resultats són la mitja \pm SEM de 6 animals per grup.

L'alteració en l'expressió de molècules de MHC de classe I, classe II i en el gen de l'IGF-II, podrien mimetitzar, en certa manera, els efectes dels *locus IDDM1* i *IDDM2*, descrits en els pacients amb susceptibilitat a desenvolupar diabetis tipus 1. Tot i això però, els ratolins IGF-II no desenvolupaven per si sols un procés diabètic obert. Aquests ratolins transgènics es troben en un fons genètic C57BL/6;SJL, que no predisposa a desenvolupar infiltració limfocitària, per tant, tot i les alteracions presents en molècules del sistema immune, possiblement la manca d'infiltració impedia que acabessin desenvolupant diabetis oberta.

Així doncs, l'expressió d'IGF-II en les cèl·lules β d'aquests ratolins transgènics donava lloc a una sèrie d'alteracions en la morfologia i organització dels illots, així com també en gens importants per la funcionalitat pròpia d'aquests cèl·lules. Totes aquestes portaven als animals RIP/IGF-II a desenvolupar pre-diabetis. Moltes de les alteracions descrites en aquests ratolins transgènics, tant a nivell morfològic, com a nivell funcional, es troben també en altres models animals espontanis de diabetis tipus 2, com poden ser les rates GK o els ratolins NZO (Hoog, 1996; Chankiewicz, 2006). Tot i presentar però aquestes alteracions, aquests ratolins no desenvolupaven diabetis oberta de forma espontània.

S'ha descrit que les alteracions en la funcionalitat de les cèl·lules β serien un component clau, i no una simple conseqüència en la patologia de la diabetis tipus 2 (Kahn, 2003; Marchetti, 2006). Certs grups postulen que factors ambientals que provoquessin la disfunció de les cèl·lules β , acabarien accelerant també el procés diabètic (Wilkin, 2001; Mathis, 2001; Donath, 2003; Mandrup-Poulsen, 2003). Tant en la diabetis tipus 1 com en la tipus 2, factors ambientals actuarien com a factors acceleradors en individus genèticament susceptibles. En el cas de la diabetis tipus 1 aquests factors podrien ser per exemple la dieta, infeccions víriques, estrès o certs antibiòtics; i en el de la diabetis tipus 2 serien la obesitat, l'estrès o el sedentarisme, entre altres (Wilkin, 2001).

Donat que moltes de les alteracions descrites en les cèl·lules β dels ratolins RIP/IGF-II, són pròpies d'un estat pre-diabètic tipus 2, en la segona part d'aquest treball, ens vam plantejar examinar si totes aquestes alteracions podrien fer que aquests ratolins fossin més vulnerables a desenvolupar una diabetis oberta en presència d'un factor ambiental que accelerés el procés. Es van voler utilitzar factors acceleradors que actuessin de forma específica sobre les cèl·lules β pancreàtiques. És per això que vam escollir en primer lloc el tractament amb estreptozotocina, que simularia un efecte tòxic, específic per les cèl·lules β ; i en segon lloc, la presència d'un procés autoimmune, que seria un procés més crònic i més propi de la patologia diabètica.

2. ESTUDI DE LA SUSCEPTIBILITAT DELS ANIMALS TRANSGÈNICS RIP/IGF-II AL TRACTAMENT AMB ESTREPTOZOTOCINA (STZ).

Per tal de valorar la susceptibilitat dels ratolins IGF-II a desenvolupar diabetis oberta, vam escollir en primer lloc com a estímul accelerador, un factor que actués específicament sobre les cèl·lules β pancreàtiques, és per això que utilitzàrem el tractament amb STZ.

S'ha de tenir en compte però, que els ratolins transgènics RIP/IGF-I, que expressen IGF-I de forma local en les cèl·lules β pancreàtiques, recuperen la massa de cèl·lules β i contraresten la citotoxicitat provocada pel tractament amb STZ (George, 2002). S'ha descrit que el factor de creixement IGF-II té importants efectes anti-apoptòtics, és capaç d'induir *in vitro* la proliferació i la diferenciació de les cèl·lules β , i està també involucrat en el creixement i diferenciació dels illots (Hill, 2000; Rabinovitch, 1982; Hogg, 1993). Per tant, el fet de sobreexpressar IGF-II a nivell de les cèl·lules β pancreàtiques, i donades les similituds existents entre els factors de creixement IGF-I i IGF-II, podria donar lloc a que aquesta expressió bloquegés l'efecte del tractament amb STZ, tal i com s'ha descrit que succeeix en els ratolins RIP/IGF-I (George, 2002).

2.1. ESTUDI DE LA SUSCEPTIBILITAT AL TRACTAMENT AMB 40 mg/Kg DE STZ.

Vam iniciar l'estudi de susceptibilitat al tractament amb STZ injectant 5 dosis consecutives de 40 mg/Kg de STZ, a ratolins control i transgènics IGF-II de dos mesos d'edat. Aquest tractament es coneix com a injecció de múltiples dosis baixes d'estreptozotocina (MLD STZ). Es va escollir aquesta dosi perquè s'ha descrit que indueix la formació de radicals lliures i d'òxid nítric que donen lloc a l'apoptosi de les cèl·lules β i porten al desenvolupament de diabetis oberta en ratolins control (Like & Rossini, 1976; O'Brien, 1996). D'aquesta manera es podia comprovar si les alteracions en les cèl·lules β dels ratolins transgènics IGF-II els feien ser susceptibles a desenvolupar diabetis, o, si el contrari, el fet de sobreexpressar IGF-II a nivell de les cèl·lules β bloquejava l'efecte del tòxic, tal i com succeeix en els animals transgènics que expressen IGF-I a les cèl·lules β del pàncrees (George, 2002).

2.1.1. Seguiment de la glucèmia.

En primer lloc, es va realitzar un seguiment de la glucèmia dels animals durant 3 mesos. La mesura es realitzava sempre en estat d'alimentació i a la mateixa hora al llarg de tot l'estudi. Es va obtenir una primera mesura el dia 0, dia previ a la primera injecció de STZ, per tal de tenir un valor de referència de la glucèmia dels mateixos animals. Tant els animals control, com els transgènics presentaven ja una marcada hiperglucèmia una setmana després d'iniciar el tractament. Un mes després ambdós grups, assoliren concentracions de glucosa en sang al voltant de 600 mg/dL (límit màxim de detecció del Glucometer Elite®) (Fig. 15A). L'evolució de la glucèmia va ser molt similar entre els dos grups i, en finalitzar l'estudi, tant els animals control com els transgènics IGF-II presentaven hiperglucèmia, característica de la diabetis. També, als 2 i 3 mesos després del tractament es van prendre mostres de sang dels animals després d'un dejuni de 16 hores, per tal de determinar així els valors de glucosa basal. Ambdós grups presentaven, tant als 2 com als 3 mesos, una marcada hiperglucèmia en dejú, característica també del procés diabètic (Fig. 15B).

Els animals transgènics RIP/IGF-II no eren capaços, doncs, de contrarestar la hiperglucèmia diabètica induïda pel tractament amb STZ, sinó que responien al tractament igual que els ratolins control.

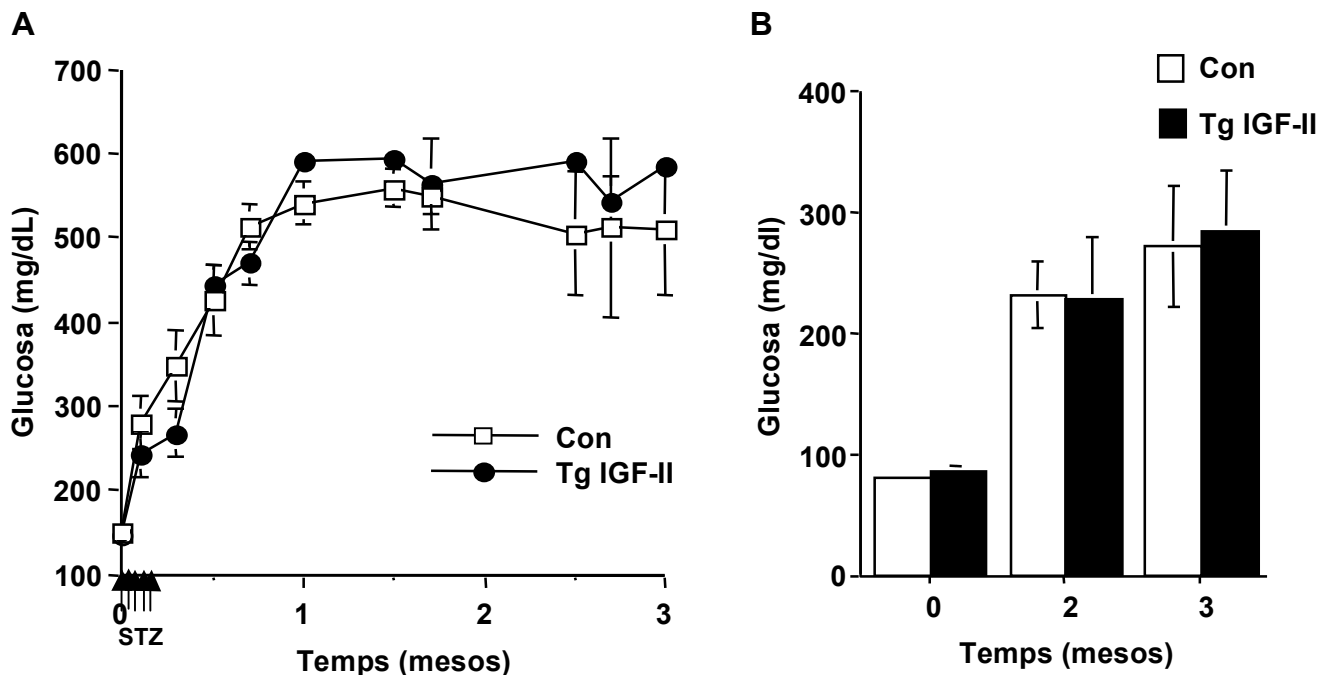


Figura 15. Glucèmia dels ratolins tractats amb 40 mg/kg de STZ. (A) Evolució de la glucèmia en alimentació. Ratolins mascles de 2 mesos d'edat, control i transgènics IGF-II, es tractaren amb dosis de 40 mg/Kg de STZ, durant 5 dies consecutius. Les mesures de glucosa es varen prendre en alimentació, abans del tractament, i posteriorment es va realitzar un seguiment de la glucèmia durant 3 mesos. Els valors són la mitja \pm SEM de 8 animals per grup. **(B) Nivells de glucèmia en dejú.** Mesures de la glucèmia després de 16 hores de dejuni. Mesures preses abans i al cap de 2 i 3 mesos després del tractament. Els resultats són la mitja \pm SEM de 8 animals per grup.

2.1.2. Determinació dels nivells d'insulina circulant.

Per valorar els efectes del tractament amb STZ sobre els nivells circulants d'insulina, s'analitzaren mostres de sèrum dels animals abans i 3 mesos després del tractament. Els ratolins transgènics RIP/IGF-II presentaven hiperinsulinèmia abans del tractament (Devedjian, 2000). Després del tractament, però, s'observà que tant els ratolins control com els transgènics IGF-II, en alimentació, presentaven nivells d'hipoinsulinèmia similars (Fig. 16). Aquests resultats concordaven amb la hiperglucèmia observada en ambdós grups. En els ratolins transgènics IGF-II però, la disminució dels nivells d'insulina era major, ja que passaven de valors d'hiperinsulinèmia, abans del tractament, a una marcada hipoinsulinèmia després de la inducció de diabetis experimental.

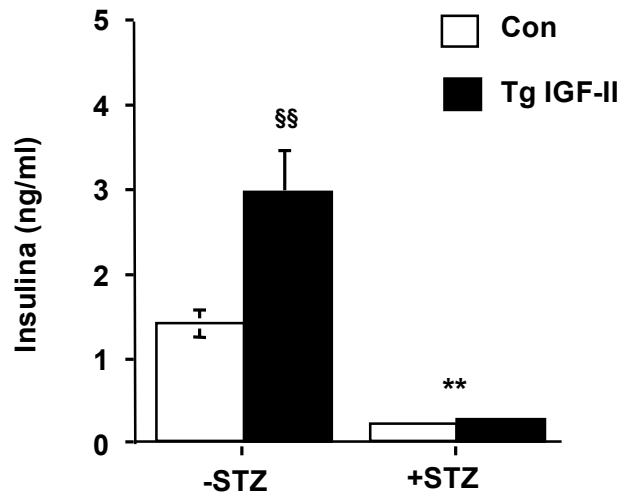


Figura 16. Nivells d'insulinèmia. Es va determinar la concentració d'insulina en sèrum dels ratolins control i transgènics IGF-II abans i 3 mesos després del tractament amb STZ. Els resultats són la mitja ± SEM de 8 animals per grup (§ respecte Control no tractat ; §§ p<0.01; * ratolins tractats vs. no tractats; ** p<0.01).

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

Per comprovar si la disminució en els nivells d'insulina circulant era degut a una pèrdua de la massa de cèl·lula β es va realitzar una anàlisi morfològica dels pàncrees d'aquests animals. Per això, es varen realitzar talls seriatos dels pàncrees dels ratolins control i transgènic en els que es va delimitar l'àrea de cèl·lula β amb una tinció immunohistoquímica anti-insulina (Fig. 17A). S'ha descrit que el tractament amb MLD STZ induïx una infiltració limfocitària dels illots en algunes soques de ratolins (Like & Rossini, 1976; O'Brien, 1996). Els transgènics IGF-II però, es troben en un fons genètic C57BL/6;SJL, aquesta és una soca molt resistent a desenvolupar insulinitis en els illots (Rossini, 1977), és per això que aquests ratolins no presentaven d'infiltració després del

tractament (Fig. 17A). Els transgènics RIP/IGF-II presentaven abans del tractament, hiperplàsia de les cèl·lules β , una massa 3 vegades superior a la dels ratolins control (Devedjian, 2000). Al finalitzar l'estudi, tots dos grups presentaven una marcada reducció de la massa de cèl·lula β (Fig. 17B), en el cas dels controls la pèrdua era del 80%, en els transgènics aquesta pèrdua arribava a ser del 93%. Aquesta major pèrdua de cèl·lules β , concordava amb la major disminució en els nivells d'insulina circulant, i la hiperglucèmia observades en els ratolins IGF-II. Tot i la presència del factor de creixement a nivell de les cèl·lules β , els animals transgènics RIP/IGF-II no eren capaços, doncs, de contrarestar la pèrdua de cèl·lula β induïda pel tractament amb STZ, sinó que, tot el contrari, perdien més massa de cèl·lules β que no els ratolins control.

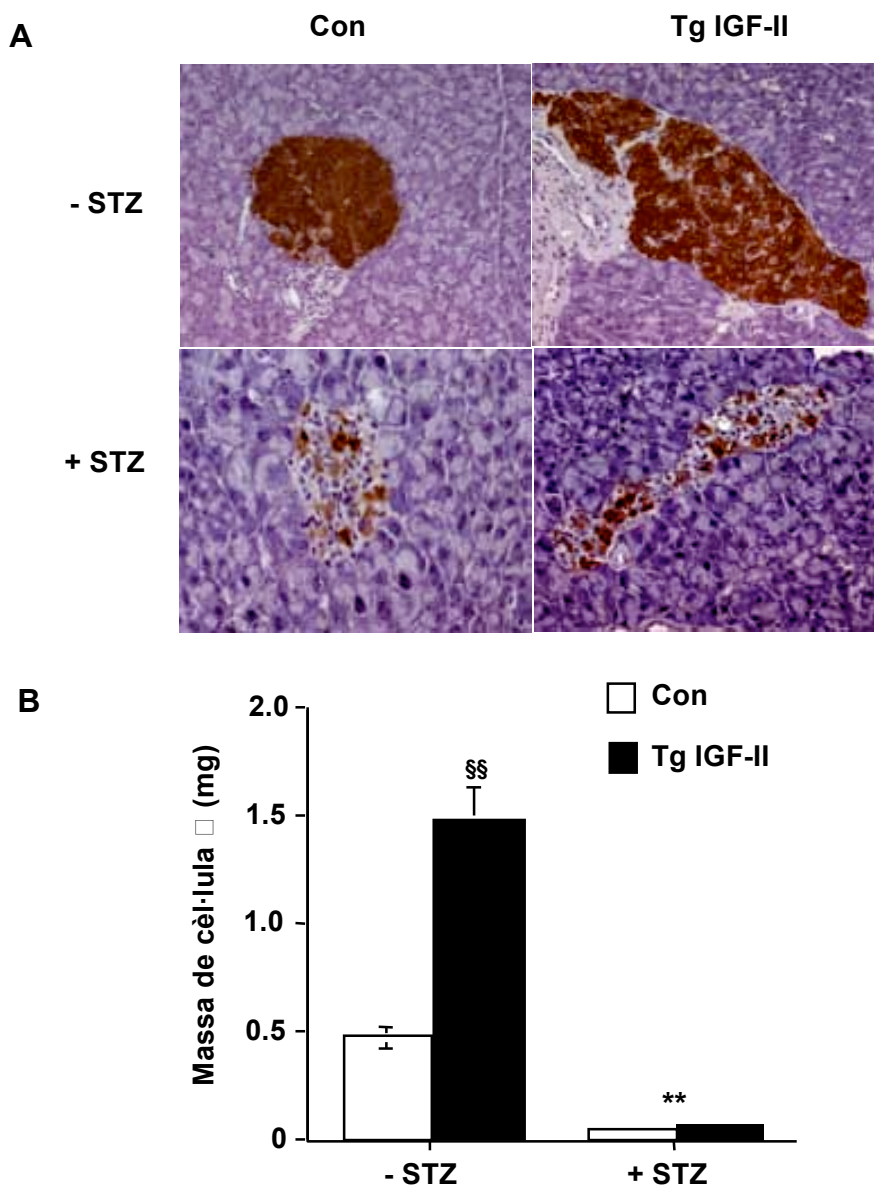


Figura 17. Determinació de la massa de cèl·lula β . (A) Anàlisi immunohistoquímiques per detectar l'expressió d'insulina en els illots pancreàtics de ratolins control i transgènics IGF-II, abans i 3 mesos després del tractament amb STZ. Ampliació x200 -STZ i x400 +STZ. (B) Es va determinar la massa de cèl·lula β pancreàtica dels ratolins control i transgènics IGF-II abans i 3 mesos després del tractament amb STZ, tal i com es descriu a Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja \pm SEM de 4 animals per grup (§ respecte Control no tractat; §§ $p < 0.01$; * ratolins tractats vs. no tractats; ** $p < 0.01$).

2.1.4. Detecció de l'apoptosi de la cèl·lula β .

S'ha descrit que la injecció de múltiples dosis baixes d'estreptozotocina (MLD STZ) destrueix la cèl·lula β principalment per apoptosi (O'Brien, 1996). El pic d'apoptosi es detecta aproximadament al dia 10 després del tractament amb MLD STZ (Like, & Rossini, 1976). Així doncs, a dia 10 després del tractament es sacrificaren 4 animals de cada grup experimental, per tal de comprovar si la sobreexpressió d'IGF-II en les cèl·lules β pancreàtiques disminuïa el grau d'apoptosi que provoca el tractament amb MLD STZ.

La determinació de l'índex d'apoptosi es va realitzar mitjançant una anàlisi immunohistoquímica que ens va permetre detectar i contar 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 de DNA, característica pròpia del procés apoptòtic. Es varen incubar alhora, els pàncrees dels ratolins control i transgènics, amb els següents anticossos: anti-glucagó, anti-PP i anti-somatostatina, i es va realitzar un marcatge dels nuclis apoptòtics mitjançant la tècnica de TUNEL (Fig. 18A). No s'observaren diferències entre controls i transgènics ni abans ni després del tractament amb STZ (Fig. 18B). En tots dos grups l'apoptosi era pràcticament nul·la a l'inici de l'estudi, i, tant en uns com en els altres s'observà un increment significatiu de l'apoptosi després del tractament.

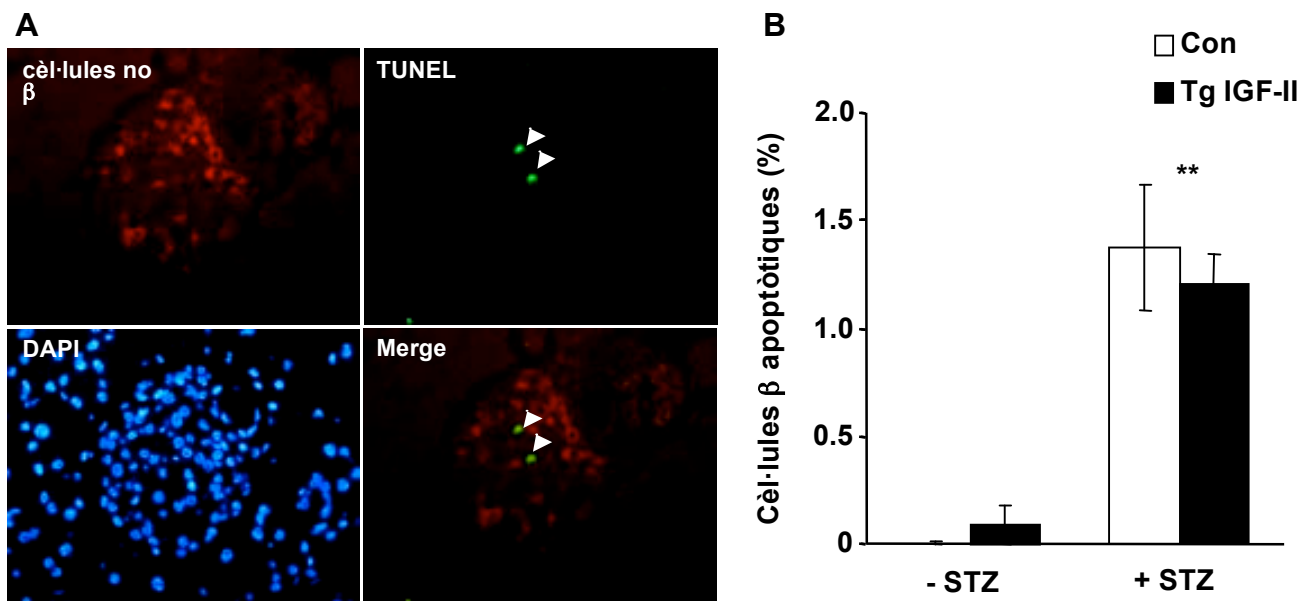


Figura 18. Determinació de l'apoptosi de les cèl·lules β 10 dies després del tractament amb STZ. (A) Anàlisi immunohistoquímiques per tal de detectar l'apoptosi en animals control i transgènics IGF-II abans i 10 dies després del tractament amb STZ; realitzat tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Ampliació 400x. **(B)** Anàlisi de l'índex d'apoptosi en els diferents grups experimentals. En la gràfica es representa el percentatge de cèl·lules β apoptòtiques. L'anàlisi es va realitzar tal i com es descriu en l'apartat de Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja \pm SEM de 4 animals per grup (* ratolins tractats vs. no tractats; ** $p < 0.01$).

2.1.5. Detecció de la replicació de la cèl·lula β .

L'IGF-II és capaç d'induir *in vitro* la proliferació i la diferenciació de les cèl·lules β (Rabinovitch, 1982; Hogg, 1993) i està involucrat en la regulació del creixement i diferenciació dels illots (Han, 1988; Le Roith, 1997). Per aquest motiu es va determinar també la taxa de replicació de les cèl·lules β en animals control i transgènics, abans i 10 dies després del tractament amb 40 mg/Kg de STZ. La taxa de replicació es va quantificar mitjançant una doble tinció amb un anticòs anti-insulina i un anticòs anti-Ki67. Aquesta proteïna s'ha descrit que s'expressa a nivells baixos durant la fase final de G1 i que s'acumula durant les fases S, G2 i M (Starborg, 1996), i s'utilitza en molts casos com indicador de replicació.

No s'observaren diferències en la taxa de replicació dels pàncrees dels animals control i transgènics RIP/IGF-II abans del tractament. El manteniment de la massa de cèl·lules β depèn de l'equilibri entre l'apoptosi, la replicació i la neogènesi d'aquestes cèl·lules. Degut a la destrucció de les cèl·lules β després del tractament amb MLD STZ, s'indueix la replicació de les cèl·lules β com a mecanisme per tal d'intentar compensar aquesta pèrdua de cèl·lules. Aquest increment compensatori s'observava tant en animals control com transgènics RIP/IGF-II (Fig. 19). Per tant, l'expressió d'IGF-II en aquests ratolins transgènics no induïa un increment ni en la replicació basal de les cèl·lules β , ni en la replicació compensatòria d'aquestes cèl·lules després del tractament.

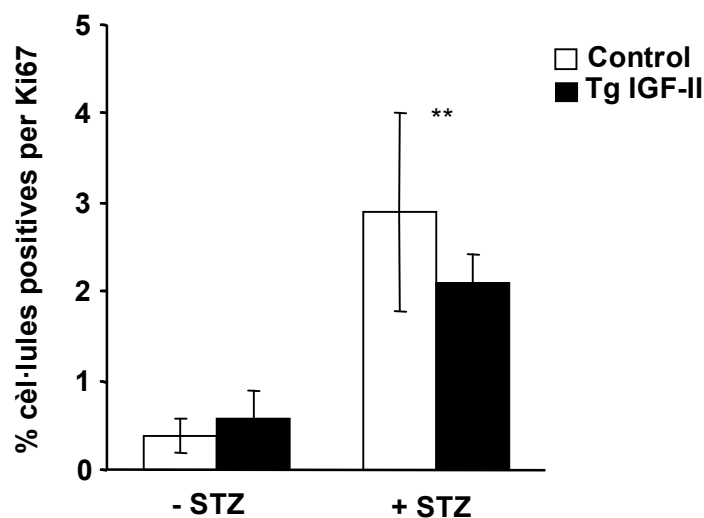


Figura 19. Determinació de la taxa de replicació de les cèl·lules β 10 dies després del tractament amb 40 mg/kg STZ. Índex de replicació en animals control i transgènics IGF-II abans i 10 dies després del tractament, realitzat tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja \pm SEM de 4 animals per grup (*ratolins tractats vs. no tractats; ** $p < 0.01$).

En aquesta primera part, es va comprovar doncs, que el tractament amb 40 mg/Kg de STZ induïa un procés apoptòtic en les cèl·lules β dels ratolins transgènics RIP/IGF-II, que donava lloc a una pèrdua de la massa d'aquestes cèl·lules i a la consegüent hipoinsulinèmia i hiperglucèmia. La pèrdua de massa en els transgènics IGF-II era fins i tot superior a la observada en els ratolins control. A diferència, per tant del que s'havia descrit per l'IGF-I (George, 2002), l'expressió d'IGF-II en aquest model transgènic, no és capaç de contrarestar el procés diabètic.

2.2. ESTUDI DE LA SUSCEPTIBILITAT AL TRACTAMENT AMB 20 mg/Kg DE STZ.

S'ha descrit que en ratolins control el tractament amb dosis molt baixes de STZ (20 mg/Kg) no resulta ser diabetogènic. Els ratolins control tractats amb aquesta dosi són capaços de mantenir la normoglucèmia i no arriben a desenvolupar diabetis després d'aquest tractament (Casellas, 2006). Donat que els ratolins transgènics IGF-II semblaven ser una mica més susceptibles que els ratolins control, al tractament amb 40 mg/Kg de STZ, a continuació ens vàrem plantejar analitzar la susceptibilitat d'aquests animals transgènics al tractament amb dosis molt baixes de STZ (aquest tractament es coneix com a *Multiple very low dosis of STZ, MVLD STZ*).

Ratolins control i transgènics RIP/IGF-II de 2 mesos d'edat s'injectaren intraperitonealment amb una dosi de 20 mg/Kg de STZ durant 5 dies consecutius. Posteriorment, es va realitzar un estudi per tal de determinar si els animals transgènics RIP/IGF-II eren més susceptibles que els ratolins control.

2.2.1. Seguiment de la glucèmia.

En primer lloc es va realitzar un seguiment de la glucèmia dels animals. Les mesures es realitzaren sempre en estat d'alimentació i a la mateixa hora al llarg de tot l'estudi. Es va obtenir una primera mesura el dia 0, dia previ a la primera injecció del tractament amb *MVLD STZ*, per tal de tenir un valor de referència de la glucèmia dels mateixos animals. Després del tractament, el seguiment es va fer cada setmana durant els 6 mesos que va durar l'experiment.

Es va observar, que l'administració d'aquesta dosi de STZ no provocava cap canvi en la glucèmia dels animals control, ja que aquests es mantenien normoglucèmics durant el transcurs de tot l'experiment. Aquesta mateixa dosi, en canvi, sí que afectava a la homeòstasi de la glucosa dels animals transgènics IGF-II, ja que, aproximadament la meitat d'aquests animals, presentaven hiperglucèmia, valors de glucèmia en alimentació superiors als 250 mg/dL (Fig.

20A). Per tal de valorar també els efectes del tractament amb *MVLD STZ* sobre els nivells bassals de glucosa, es va procedir a determinar-ne la concentració després de 16 hores de dejuni. Els animals control no presentaven alteracions, sinó que presentaven nivells de normoglicèmia als 2 i 4 mesos després del tractament (Fig. 20B). En els animals transgènics IGF-II, en canvi, s’hi podien distingir dues poblacions diferents. Una primera població, que als dos mesos presentava normoglicèmia en alimentació i hipoglicèmia en dejú, de manera similar als animals control. I una segona població, que als dos mesos presentava hiperglicèmia tant en alimentació com en dejú. Les diferències entre ambdues poblacions incrementaven als 4 mesos després del tractament (Fig. 20B).

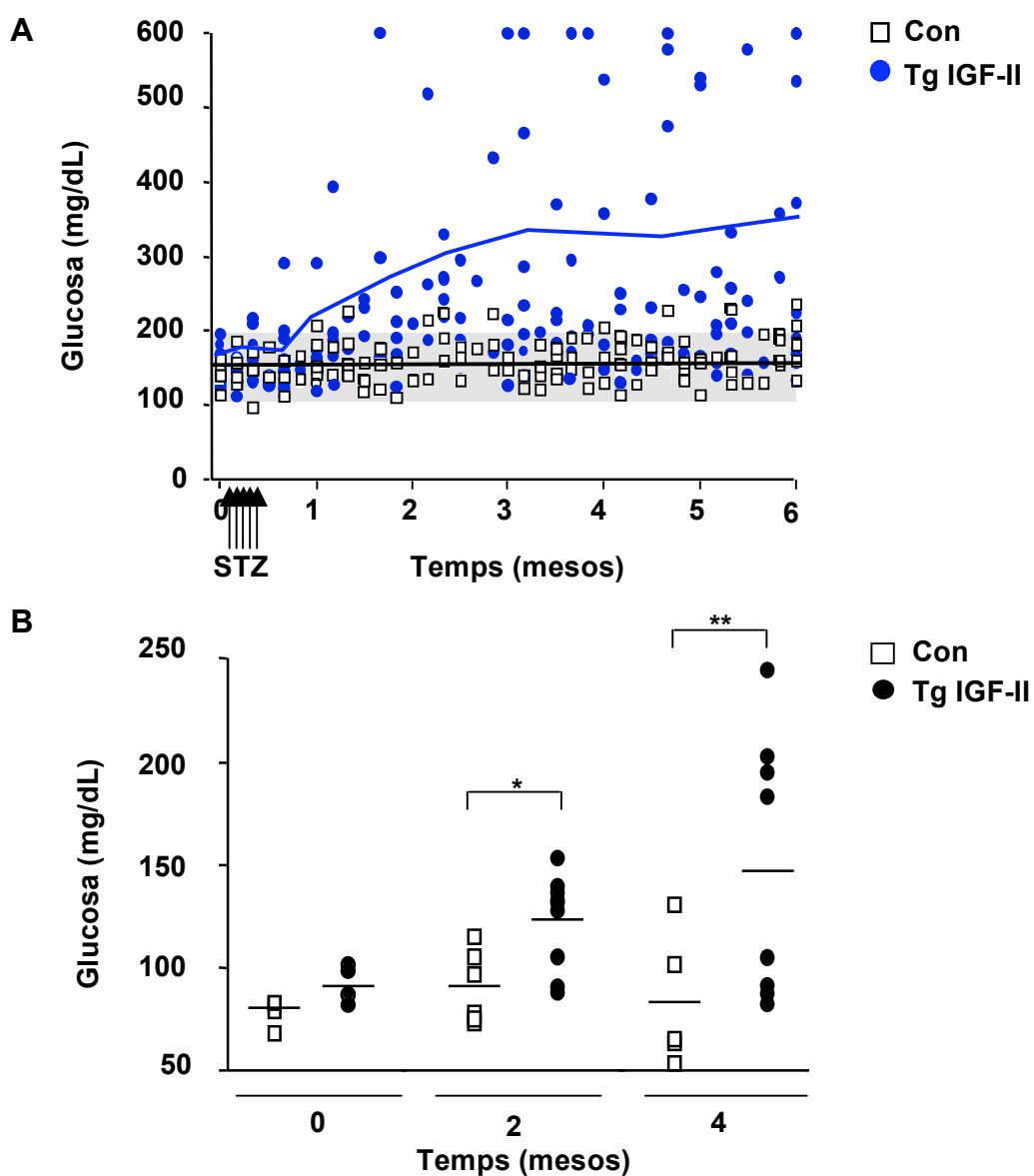


Figura 20. (A) Seguiment de la glucèmia en alimentació. Els nivells de glucosa en sèrum en alimentació es varen prendre als ratolins control (quadrats blancs) i als transgènics IGF-II (cercles blaus) abans i després del tractament amb 20 mg/Kg de STZ. La línia representa la mitja ± SEM de 16 animals per grup (negre=controls; blava= Tg IGF-II). **(B) Nivells de glucèmia en dejú.** Mesures de la glucèmia després d’un dejú de 16 hores. Es representa el resultat de 8 animals per grup. La línia representa la mitja ± SEM dels animals avaluats (*p<0.05; **p<0.01).

2.2.2. Anàlisi del percentatge de ratolins que desenvolupen diabetis després del tractament amb 20 mg/Kg de STZ.

Es va mesurar el percentatge d'animals que anaren desenvolupant hiperglucèmia diabètica al llarg de l'estudi, considerant sempre com a animal diabètic aquell que presenta una glucèmia superior a 250 mg/dL durant 3 mesures consecutives. El *MVLD STZ* afectà a un percentatge important dels animals transgènics, ja que un 42% d'aquests desenvoluparen diabetis. La resta es mantenien en nivells de normoglucèmia o lleugera hiperglucèmia durant tot l'experiment (Fig. 21). Seguint el mateix criteri no s'observà l'aparició de diabetis en cap dels ratolins control tractats amb *MVLD STZ*.

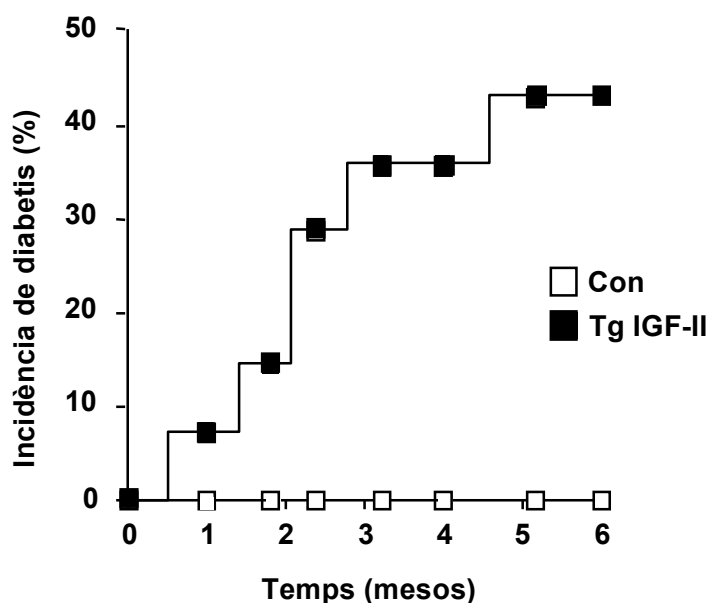


Figura 21. Evolució del percentatge d'animals que desenvoluparen diabetis. Es va considerar que un ratolí era diabètic quan la seva glucèmia superava, en 3 mesures consecutives, valors de 250 mg/dL. Els resultats són la mitja \pm SEM de 16 animals per grup.

2.2.3. Anàlisi histològica dels pàncrees dels ratolins.

Es va realitzar a continuació un estudi histològic del pàncrees per tal de comprovar si les alteracions observades eren degudes a una pèrdua de la massa de cèl·lules β . Es van sacrificar els animals i es va procedir a la mesura de la massa de cèl·lula β . Es va delimitar l'àrea de cèl·lula β amb una tinció immunohistoquímica anti-insulina (Fig. 22). A partir d'aquestes preparacions es va mesurar la massa de cèl·lula β dels diferents grups experimentals (Fig. 23). Tal i com succeïa en el tractament amb 40 mg/Kg de STZ, no s'observava infiltració limfocitària en els illots dels ratolins control, ni tampoc en els dels transgènics després del tractament, donat al fet que es troben en un fons genètic C57BL/6;SJL (Fig. 22).

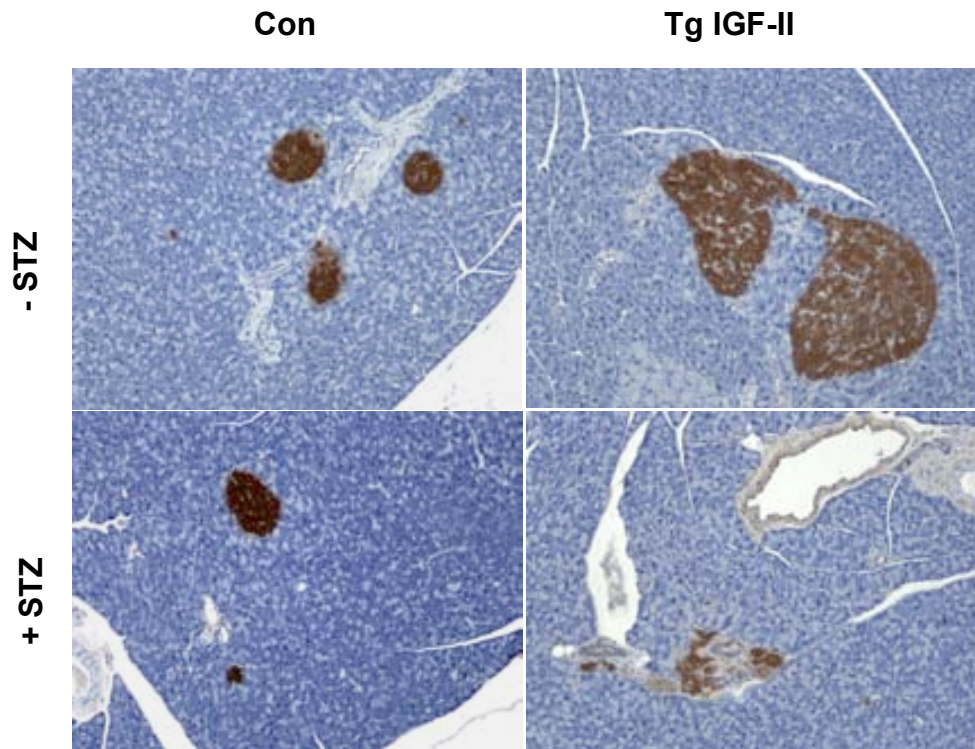


Figura 22. Anàlisi immunohistoquímica dels pàncrees. Detecció de l'expressió d'insulina en els illots pancreàtics de ratolins control i transgènics IGF-II, sense tractar amb STZ i 6 mesos després del tractament amb 20 mg/kg STZ. Es varen realitzar talls histològics dels pàncrees d'animals dels diferents grups experimentals i s'incubaren amb un anticòs anti-insulina, tal i com s'indica en l'apartat de Materials i Mètodes. Ampliació 200x..

Els animals control no presentaven diferències entre els valors de massa de cèl·lula β observats en els animals no tractats i els observat després del tractament amb STZ (Fig. 23A). En el cas dels ratolins transgènics, donat al fet que no tots els animals responien igual al tractament, els vam dividir en dues subpoblacions: 1) aquells ratolins que es mantenien normoglicèmics després del tractament, i 2) aquells ratolins que desenvolupaven hiperglicèmia, diabetis, després del tractament, que representaven el 42% del total. Per tal de valorar els efectes del tractament sobre la massa de cèl·lula β dels ratolins transgènics IGF-II vàrem fer les mesures separant els valors d'aquestes dues subpoblacions. En totes dues poblacions de ratolins transgènics IGF-II després del tractament s'observà una reducció significativa de la massa de cèl·lula β , respecte als ratolins transgènics no tractats (Fig. 23A). En el cas dels animals considerats normoglicèmics, la reducció de la massa de cèl·lula β era d'un 40% aproximadament, i, en el dels animals hiperglicèmics, diabètics, la pèrdua arribava a ser del 80% (Fig. 23B).

Totes aquestes observacions indicaven que els animals transgènics RIP/IGF-II, eren més susceptibles al tractament amb STZ, ja que després del tractament amb *MVLD* STZ, que no afecta a un animal control, un 42% dels ratolins IGF-II desenvolupava diabetis. Així doncs, els

ratolins transgènics IGF-II eren més susceptibles a desenvolupar diabetis oberta en presència d'un factor accelerador, en aquest cas la STZ.

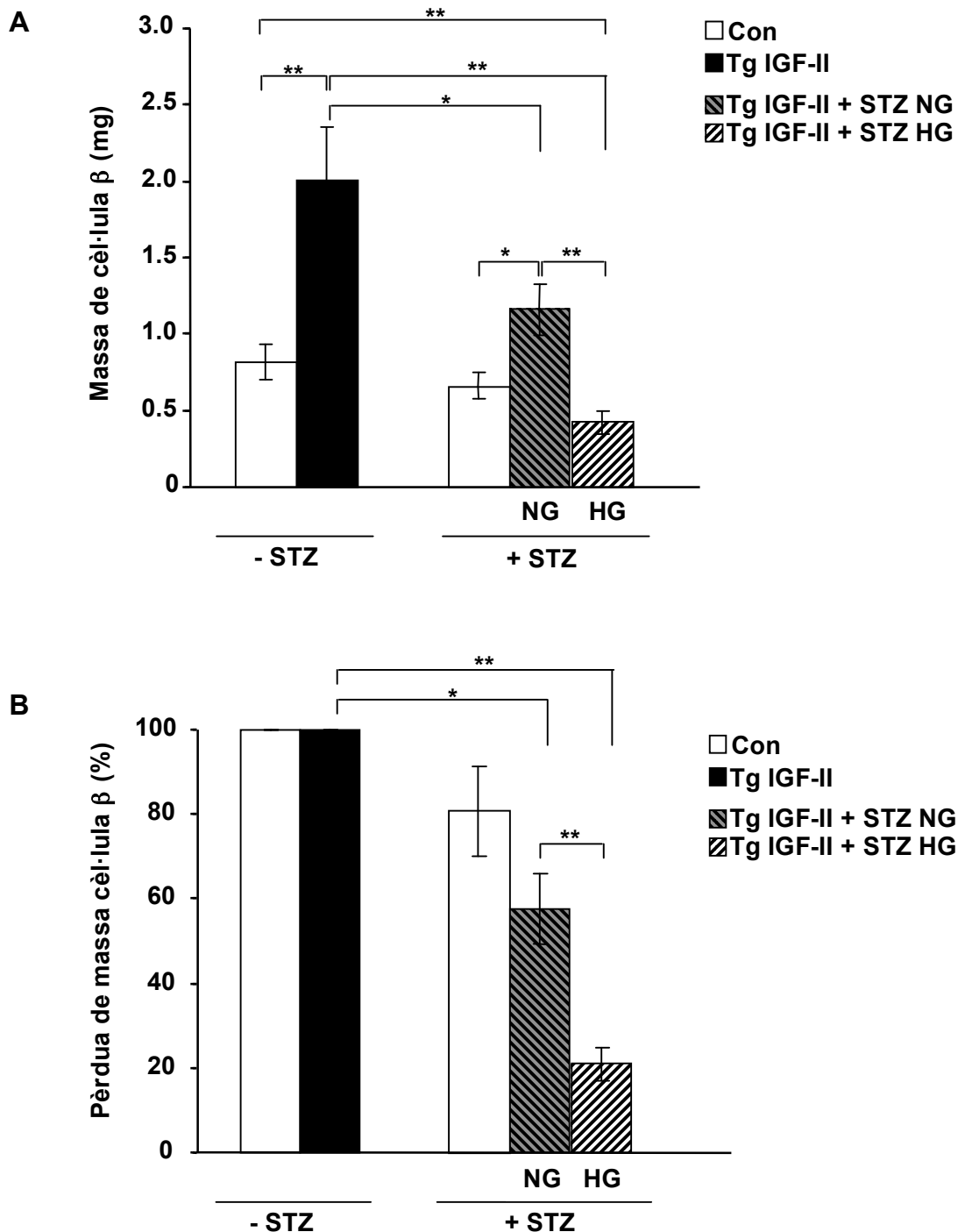


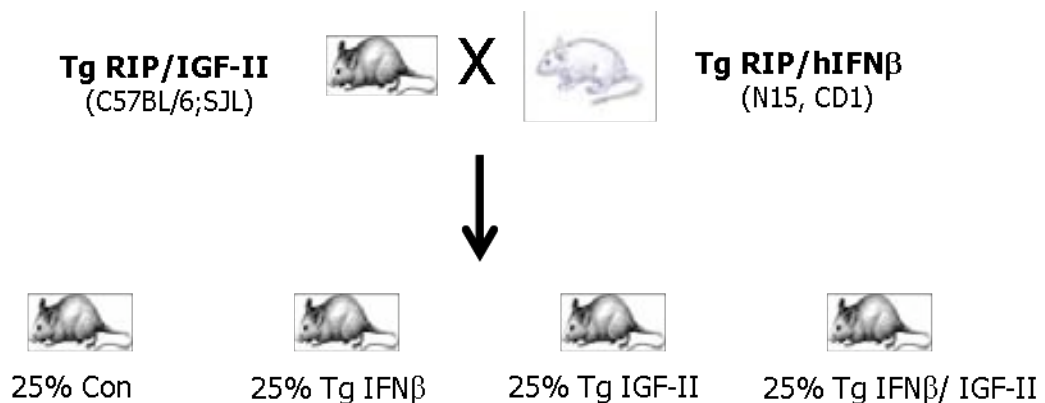
Figura 23. (A) Determinació de la massa de cèl·lula β . Es va determinar la massa de cèl·lula β pancreàtica dels ratolins control i transgènics IGF-II abans i 6 mesos després del tractament amb 20 mg/Kg de STZ. La determinació es va dur a terme tal i com s'explica a Materials i Mètodes. NG, ratolins transgènics IGF-II normoglicèmics després del tractament; HG, ratolins IGF-II hiperglicèmics després del tractament. Els resultats són la mitja \pm SEM de 10 animals per grup (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). **(B) Determinació del percentatge de pèrdua de massa de cèl·lula β .** A partir dels valors obtinguts en la determinació de la massa de cèl·lula β , es varen calcular els percentatges de pèrdua de massa després de 6 mesos de tractament amb 20 mg/Kg de STZ. Els percentatges es calcularen considerant com al 100% el valor de massa de cèl·lula β obtinguda pels animals control i transgènic abans del tractament (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

3. ESTUDI DE LA SENSIBILITAT DELS ANIMALS TRANSGÈNICS RIP/IGF-II A DESENVOLUPAR DIABETIS EN UN FONS GENÈTIC MÉS SUSCEPTIBLE.

L'estudi de susceptibilitat a desenvolupar diabetis es va realitzar a continuació utilitzant com a factor accelerador un atac immunitari. La presència d'un atac autoimmune seria un procés més crònic i més propi de la patologia diabètica, que no pas la utilització de STZ, que s'ha realitzat en l'apartat anterior. Per tal d'induir un atac autoimmune als ratolins RIP/IGF-II, aquests ratolins es creuaren amb ratolins transgènics RIP/hIFN β . Aquests animals transgènics RIP/hIFN β s'havien obtingut prèviament al nostre laboratori, i expressen interferó β humà específicament a les cèl·lules β pancreàtiques. Com a conseqüència aquests animals presenten alteracions funcionals, certa infiltració limfocitària en els illots i una major susceptibilitat a desenvolupar diabetis autoimmune (Pelegri, 1998; Alba, 2004; Casellas, 2006). Així doncs es varen generar animals doble transgènics que expressaven els gens quimèrics RIP/IGF-II i RIP/hIFN β .

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

Per dur a terme aquest estudi, es van creuar els ratolins transgènics RIP/IGF-II (fons genètic C57BL/6;SJL) amb ratolins transgènics RIP/hIFN β (fons genètic CD1). En la primera generació d'aquest creuaments s'obtingueren els 4 genotips, de fons genètic 50% C57BL/6;SJL – 50% CD1, que serien els 4 grups experimentals que s'utilitzaren per realitzar tots els estudis posteriors:



3.1.1. Comprovació de la co-expressió dels dos gens quimèrics.

Un cop obtinguts els primers animals s'analitzà immunohistoquímicament l'expressió dels dos transgens en les cèl·lules β pancreàtiques: hIFN β (Fig.24A-J) i IGF-II (Fig.24B-K). Es va observar que només era possible detectar la presència de hIFN β i IGF-II en els illots pancreàtics dels ratolins transgènics, i que l'expressió dels dos transgens a la vegada no disminuïa l'expressió de cap dels dos gens quimèrics. Per altra banda, en analitzar l'expressió de la insulina no es van observar diferències entre els pàncrees control i transgènics (Fig.24C-L). A més, es va detectar que l'expressió d'hIFN β co-localitzava amb la d'IGF-II i la d'insulina. La co-localització de les proteïnes era deguda a que la síntesi de totes elles estava regulada pel mateix promotor, el promotor del gen de la insulina-I de rata (RIP-I).

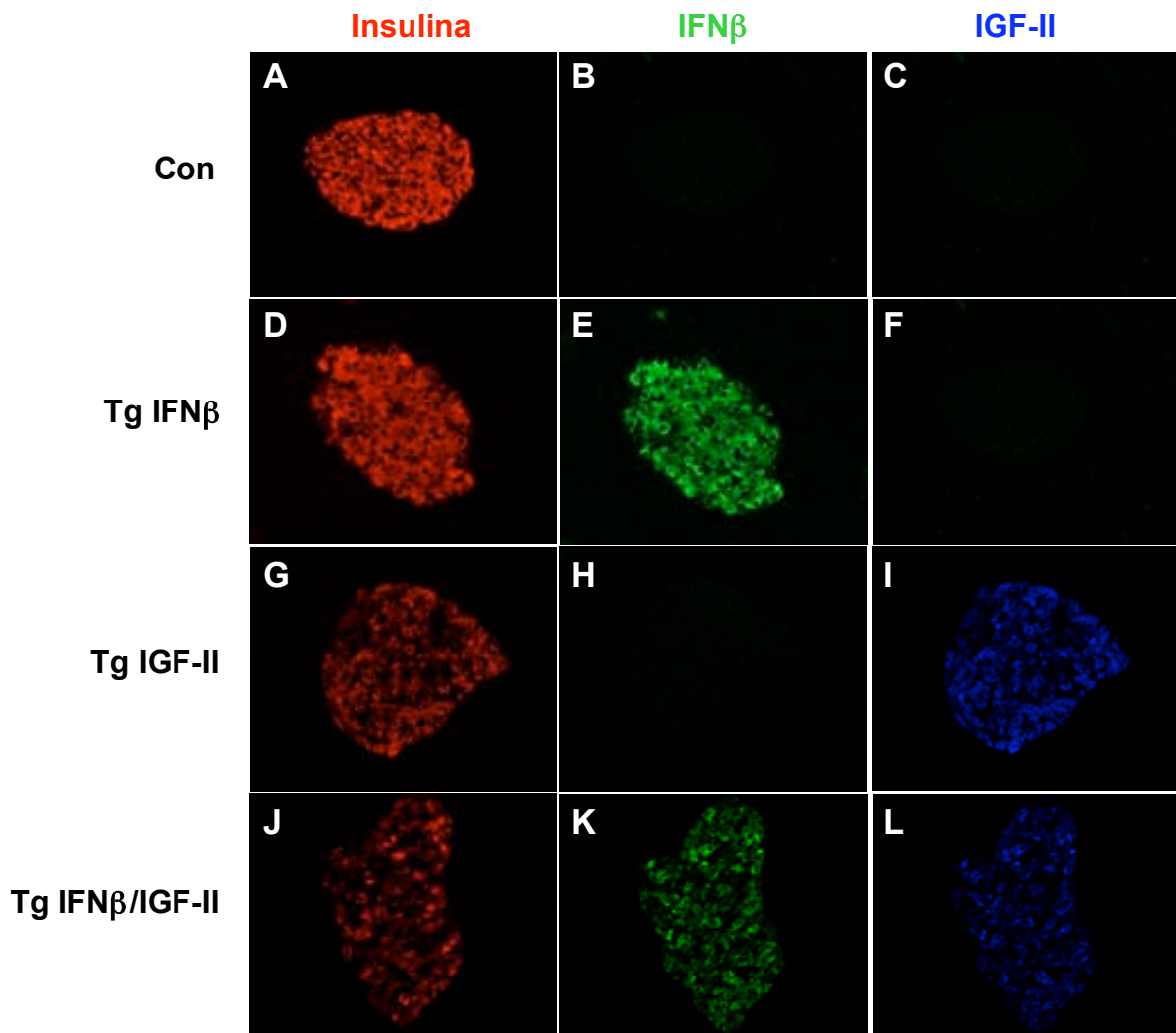


Figura 24. Anàlisi immunohistoquímica del pàncrees dels animals doble transgènics IFN β /IGF-II. Es van realitzar talls histològics de pàncrees procedents de ratolins mascles de tres setmanes d'edat controls (A,B,C), Tg IFN β (D,E,F), Tg IGF-II (G,H,I) i doble transgènics IFN β /IGF-II (J,K,L). Es van incubar amb anticossos anti-insulina (A,D,G,J), anti-IFN β (B,E,H,K) i anti-IGF-II (C,F,I,L), tal i com es descriu en l'apartat de Materials i Mètodes. Ampliació x200.

3.2. ANÀLISI METABÒLICA DELS RATOLINS DOBLE TRANSGÈNICS IFN β /IGF-II.

A continuació es va procedir a realitzar una anàlisi dels diferents paràmetres metabòlics associats a la diabetis, per tal d'examinar si els animals doble transgènics IFN β /IGF-II presentaven més susceptibilitat a desenvolupar aquesta patologia.

3.2.1. Test de tolerància a la glucosa.

En primer lloc es va realitzar un test de tolerància a la glucosa a animals d'un mes d'edat. Els animals es dejunaren durant 16 hores per tal de realitzar el test. A continuació, es va mesurar la glucèmia basal, temps 0, i, immediatament després se'ls administrà intraperitonealment una càrrega de glucosa de 2 g/Kg de pes, i es va dur a terme el seguiment de la glucèmia durant 3 hores. Els animals control i transgènics IFN β , assolien un pic de glucèmia de 300-350 mg/dl a la mitja hora d'haver iniciat el test i, ràpidament, la glucèmia disminuïa a mesura que avançava el temps, fins arribar a valors normals al final de l'experiment. A diferència d'aquests, els dos grups restants, transgènics IGF-II i doble transgènics IFN β /IGF-II, assoliren un pic de glucèmia més elevat que els anteriors, d'uns 400 mg/dL, a la mitja hora de l'inici del test, i manteniren valors per sobre de 300 mg/dl durant tot l'experiment (Fig. 25). Així doncs, els ratolins dobles transgènics IFN β /IGF-II presentaven a 1 mes d'edat una marcada intolerància a la glucosa. Per tant, les alteracions a nivell de la resposta a la sobrecàrrega de glucosa, induïdes pel fet de sobreexpressar IGF-II a les cèl·lules β pancreàtiques, també es donaven en els animals doble transgènics IFN β /IGF-II i transgènics IGF-II en aquest fons genètic 50% C57BL/6;SJL - 50% CD1, tal i com s'havia descrit en els animals transgènics IGF-II en fons genètic C57BL/6;SJL.

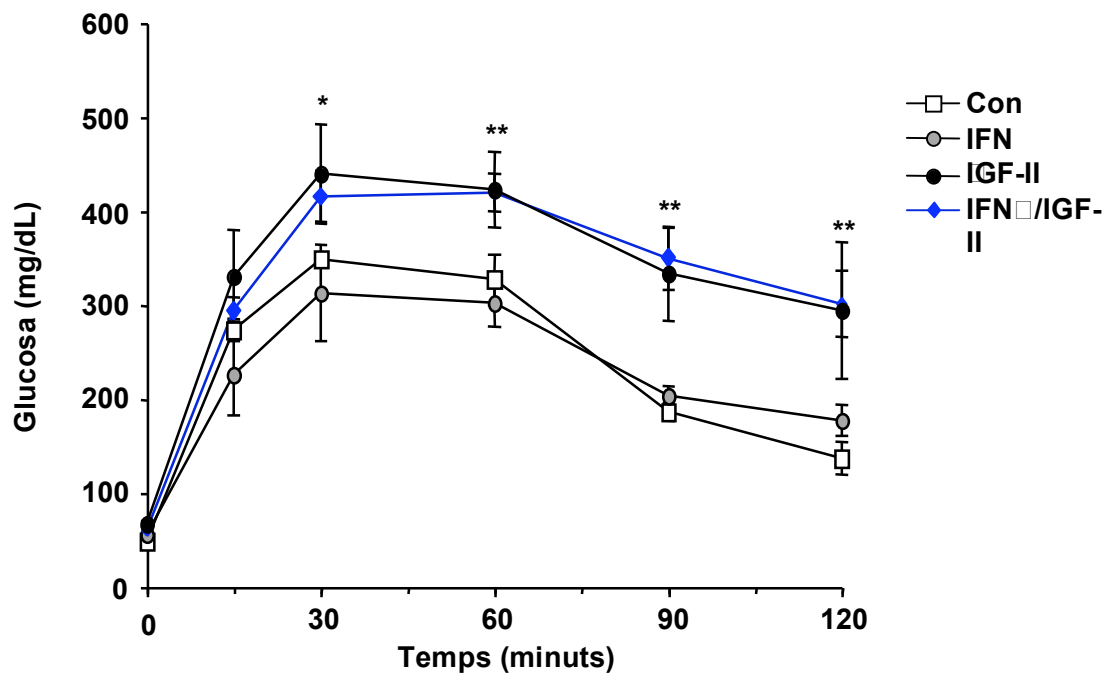


Figura 25. Test de tolerància a la glucosa. Es va administrar glucosa (2 g/Kg pes) intraperitonealment després de 16 hores de dejuni. El seguiment de la glucèmia es va realitzar cada 30 minuts. Els resultats són la mitjana \pm SEM de n= 6 animals per grup (* ratolins transgènics IGF-II i doble transgènics IFN/IGF-II respecte controls i transgènics IFN; *p<0.05, **p<0.01).

3.2.2. Seguiment de la glucèmia en alimentació.

Es va fer un seguiment durant 1 any de la glucèmia en alimentació dels ratolins mascles control, transgènics IFN, transgènics IGF-II i doble transgènics. Les mesures es varen fer cada 15 dies i sempre aproximadament a la mateixa hora. Els ratolins control i transgènics IFN presentaren valors de normoglicèmia en alimentació durant tot el transcurs del seguiment, presentant sempre valors entre 100-150 mg/dL. Els ratolins transgènics IGF-II presentaven una lleugera hiperglicèmia, amb valors entre 150-200 mg/dL. Els animals doble transgènics IFN/IGF-II, en canvi, presentaven valors de normoglicèmia (100-150 mg/dL) al deslletament (a les 3 setmanes d'edat), però s'observà un fort increment de la glucèmia a partir del primer mes d'edat, arribant a valors de 400 mg/dL i a la diabetis oberta de forma espontània als dos mesos d'edat (Fig.26). Aquests ratolins mantenien valors de hiperglicèmia, d'entre 400-600 mg/dL al llarg de tota la seva vida (sent 600 mg/dL el límit màxim de detecció de l'aparell utilitzat per les mesures). Així doncs, les alteracions anteriorment descrites en les cèl·lules dels ratolins transgènics IGF-II, al creuar-los amb un model que presenta infiltració limfocitària, donaven lloc al desenvolupament de diabetis espontània entre el primer i segon mes de vida.

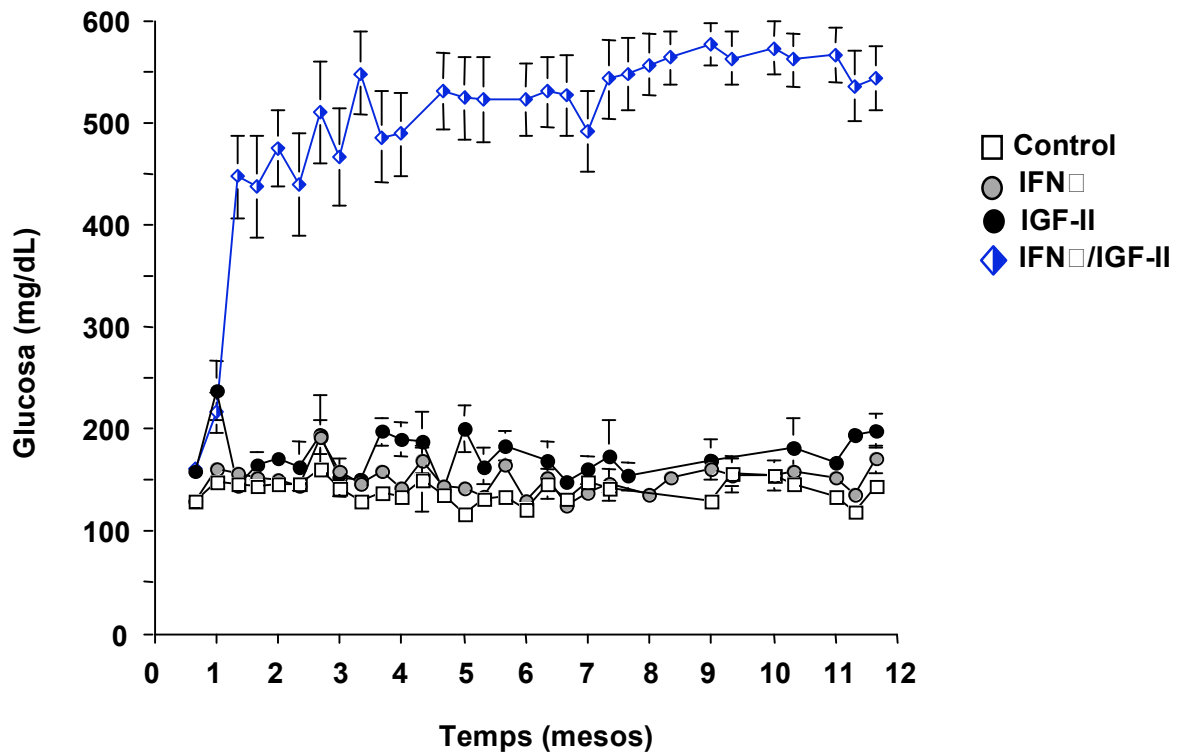


Figura 26. Seguiment de la glucèmia en alimentació. Es va realitzar un seguiment de la glucèmia en alimentació dels valors de glucosa en sang dels 4 grups experimentals. Les determinacions es feren de forma periòdica durant un any. Els resultats són la mitja \pm SEM de 40 animals per grup.

3.2.3. Anàlisi del percentatge d'individus que desenvolupen diabetis.

Per determinar quin era el percentatge d'animals doble transgènics IFN β /IGF-II que acabaven desenvolupant diabetis de forma espontània, es va analitzar el percentatge de ratolins que presentaven hiperglucèmia (>250 mg/dL) al llarg del temps. S'assumia que un ratolí era diabètic quan presentava una glucèmia superior a 250 mg/dL durant 3 mesures consecutives. Així, el 20% dels ratolins doble transgènics IFN β /IGF-II presentaven diabetis a un mes d'edat, al mes i mig aquest percentatge ja era del 60%, i la incidència arribava fins al 75% dels ratolins doble transgènics als 4 mesos d'edat. Seguint el mateix criteri no s'observà l'aparició de diabetis en cap dels ratolins control, ni transgènics IFN β , ni transgènics IGF-II (Fig. 27). En aquest cas no s'observava l'aparició de diabetis en cap dels transgènics IFN β donat que estaven en un fons genètic 50%C57BL/6;SJL – 50%CD1, i no en CD1 pur.

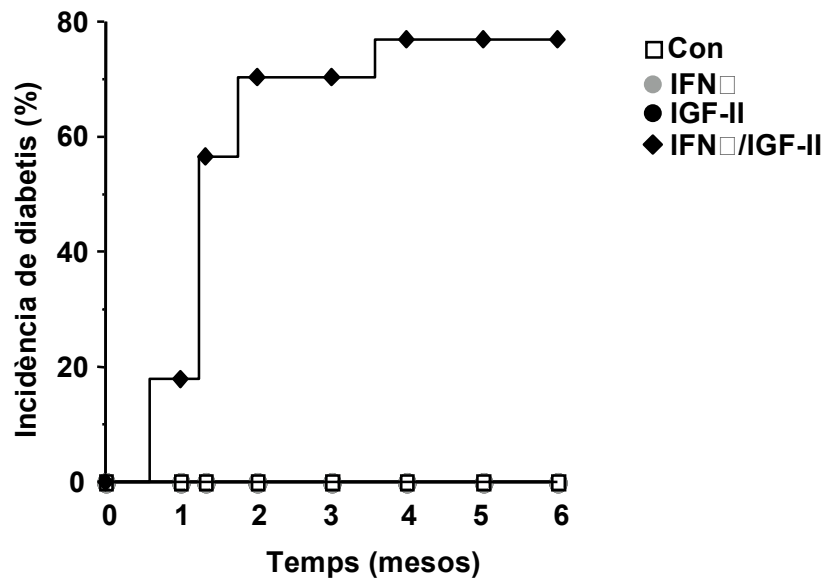


Figura 27. Evolució del percentatge de ratolins que desenvolupaven diabetis. Es considerava que un ratolí era diabètic quan la seva glucèmia superava en 3 mesures consecutives valors de 250mg/dL. Els resultats són la mitja \pm SEM de 40 animals per grup.

3.2.4. Determinació dels nivells d'insulina i hIFN β circulant.

Per tal de comprovar si la hiperglucèmia observada en els animals doble transgènics IFN β /IGF-II era deguda a una alteració en els nivells d'insulina circulant, es va procedir a determinar-ne la concentració en sèrum d'animals alimentats de 3 setmanes i de 3 mesos d'edat. Així, es va observar que a les 3 setmanes d'edat els ratolins control, transgènics IFN β i doble transgènics IFN β /IGF-II presentaven nivells de normoinsulinèmia (Fig.28A). Als 3 mesos d'edat els ratolins control i els transgènics IFN β continuaven presentant normoinsulinèmia, els transgènics IGF-II presentaven hiperinsulinèmia, i els dobles transgènics IFN β /IGF-II una disminució significativa dels nivells d'insulina circulant (Fig. 28A).

Donat que l'expressió de hIFN β ve regulada pel promotor del gen de la insulina-1 (RIP-I), vàrem examinar a continuació si la disminució dels nivells d'insulina circulant observats en els ratolins doble transgènics IFN β /IGF-II als 3 mesos, coincidien també amb una alteració en els nivells d'IFN β humà circulants (hIFN β). Es varen determinar els nivells de hIFN β en animals dels 4 grups experimentals, en alimentació, a les 3 setmanes i als 3 mesos d'edat. Es va comprovar que els ratolins controls, i transgènics IGF-II no presentaven valors detectables de la proteïna humana, donat que no expressen el transgèn (Fig. 28B). Els ratolins transgènics IFN β presentaven nivells circulants d'hIFN β del voltant de 40-50 UI/ml, tan a les 3 setmanes com als 3

mesos d'edat, tal i com s'havia descrit prèviament (Pelegrin, 1998; Casella, 2006). Els ratolins doble transgènics IFN β /IGF-II presentaven nivells d'hIFN β similars als dels ratolins IFN β a les 3 setmanes d'edat, però els nivells disminuïen significativament als 3 mesos d'edat, coincidint amb la disminució dels nivells d'insulina circulant, i l'aparició d'hiperglucèmia en aquests animals (Fig. 28B).

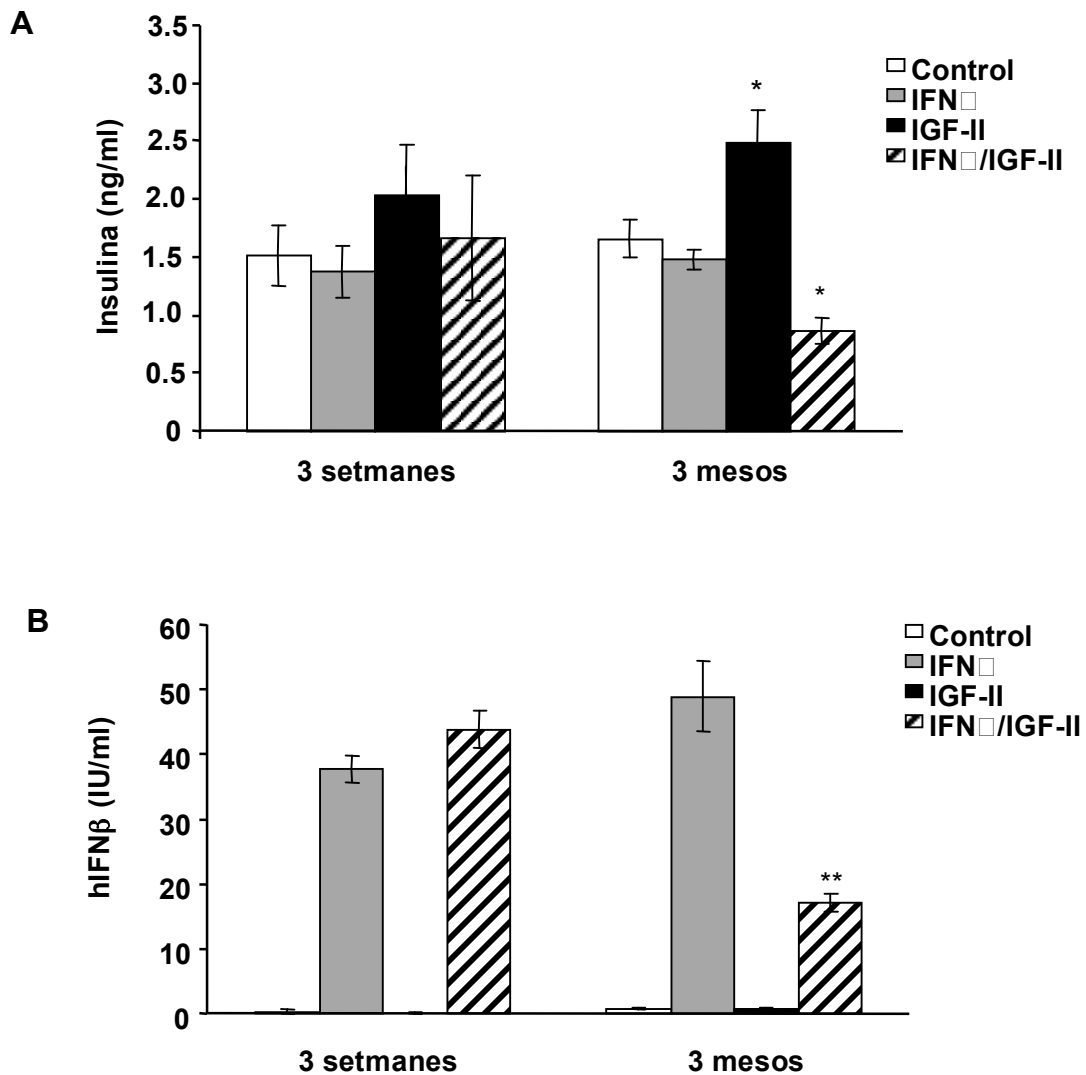


Figura 28. (A) Nivells d'insulinèmia. Valors d'insulinèmia a les 3 setmanes i als 3 mesos d'edat en animals alimentats dels 4 grups experimentals (* ratolins transgènics IGF-II i doble transgènics IFN β /IGF-II respecte la resta de grups experimentals; * $p < 0.05$). Els resultats són la mitja \pm SEM de 15 animals per grup. **(B) Detecció dels nivells circulants de hIFN β .** Valors de hIFN β en els animals dels diferents grups experimentals a les 3 setmanes i als 3 mesos d'edat. Els resultats són la mitjana \pm SEM de 10 animals de cada grup (*ratolins doble transgènics IFN β /IGF-II respecte la resta de grups experimentals; ** $p < 0.01$).

3.3. ANÀLISI DELS PÀNCREES DELS RATOLINS DOBLE TRANSGÈNICS IFN β /IGF-II.

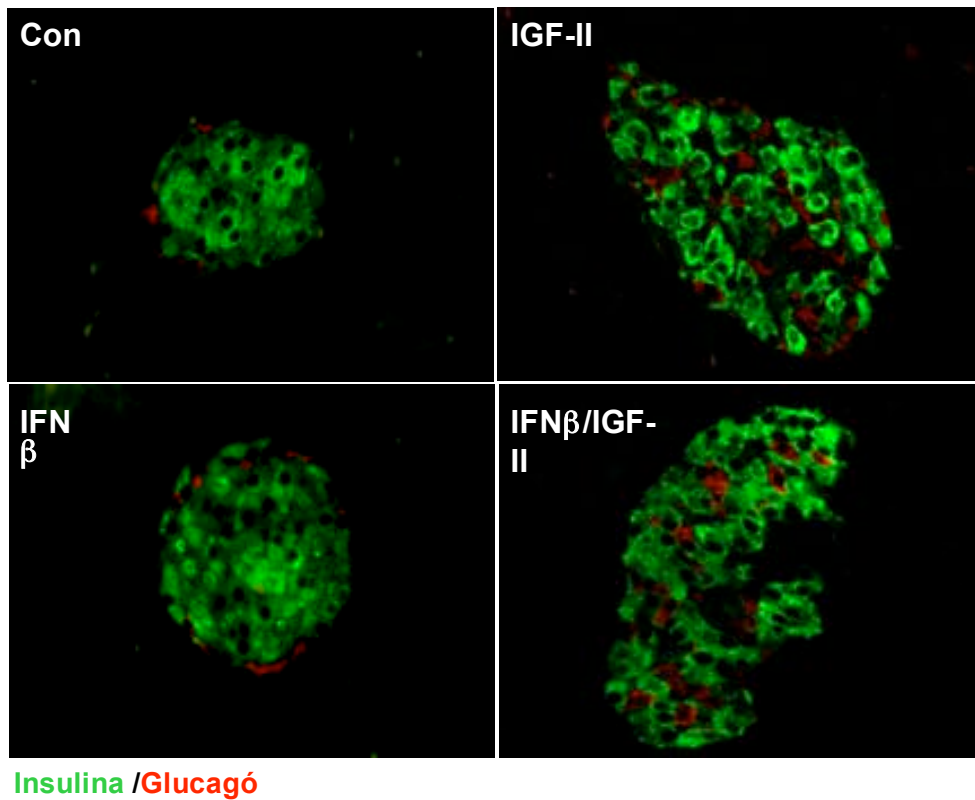
Després de l'estudi metabòlic es va realitzar una anàlisi tan morfològica com histològica del pàncrees endocrí dels animals doble transgènics IFN β /IGF-II a diferents edats, a les tres setmanes i als tres mesos d'edat. Per tal de comprovar així, si el desenvolupament de diabetis espontània en aquests ratolins, era deguda a una alteració a nivell de les cèl·lules β pancreàtiques.

3.3.1. Anàlisi histològica dels pàncrees dels ratolins doble transgènics.

En primer lloc es va realitzar una anàlisi immunohistoquímica amb anticossos anti-insulina i anti-glucagó, per determinar si hi havia alguna alteració en la morfologia o en la distribució de les cèl·lules dels illots d'aquests animals, a les 3 setmanes (Fig. 29A) i als tres mesos d'edat (Fig. 29B). En els pàncrees dels ratolins control i dels ratolins transgènics IFN β no s'observava cap tipus d'alteració ni abans del mes, ni als tres mesos d'edat. Els ratolins IGF-II presentaven illots més allargats i amb una distribució totalment alterada, amb les cèl·lules β distribuïdes per tot l'illot i no només en la perifèria. Abans del mes, els ratolins doble transgènics IFN β /IGF-II presentaven també uns illots d'estructura irregular i més desorganitzats que els illots dels ratolins control, similars als dels ratolins transgènics IGF-II (Fig. 29A). Als 3 mesos, els illots dels animals doble transgènics continuaven presentant una distribució alterada de les cèl·lules de l'illot però amb moltes menys cèl·lules β productores d'insulina (Fig. 29B).

A

Animals de 3 setmanes



B

Animals de 3 mesos

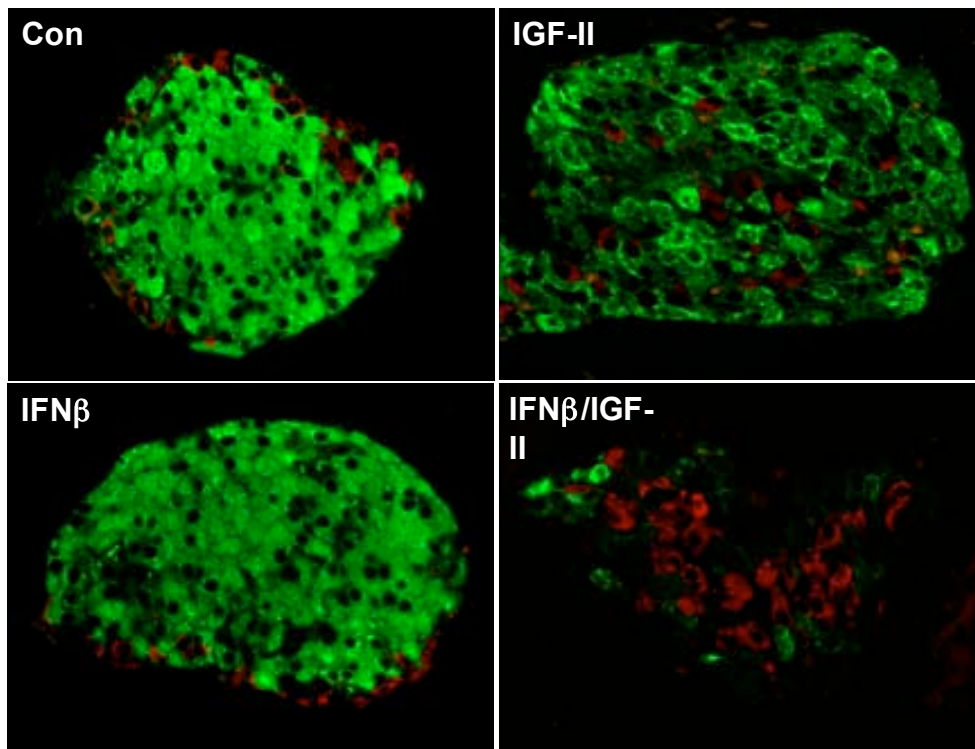


Figura 29. Anàlisi histològica dels pàncrees de ratolins de 3 setmanes i 3 mesos d'edat. Es van fer talls histològics de pàncrees dels animals de 3 setmanes i 3 mesos d'edat. Es van incubar amb anticossos anti-insulina (verd) i anti-glucagó (vermell), tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Ampliació x400.

3.3.2. Determinació de la massa de cèl·lula β dels ratolins doble transgènics.

A continuació, es va realitzar un estudi morfomètric la massa de cèl·lula β a ratolins de tres setmanes i de tres mesos d'edat. En l'anàlisi fet a ratolins de 3 setmanes d'edat no s'observaren diferències significatives entre cap dels 4 grups experimentals (Fig. 30). Quan s'analitzaren els pàncrees dels animals de 3 mesos d'edat, s'observava un increment del 50% de la massa de cèl·lula β en els ratolins control i transgènics IFN β respecte els animals de tres setmanes d'edat; increment normal, propi del creixement dels animals. Aquest increment era superior en el cas dels ratolins transgènics IGF-II, en aquest cas l'increment era del 60% respecte el valor de massa dels IGF-II a tres setmanes d'edat. Aquesta major massa de cèl·lula β , coincidia amb la hiperinsulinèmia observada en aquests animals. Els ratolins doble transgènics IFN β /IGF-II, en canvi, als 3 mesos presentaven una important reducció de la massa de cèl·lula β respecte la resta de grups experimentals. Aquesta pèrdua de massa de cèl·lula β coincidia amb la disminució dels nivells d'insulina i la hiperglucèmia observades en els animals doble transgènics d'aquesta edat (Fig. 30).

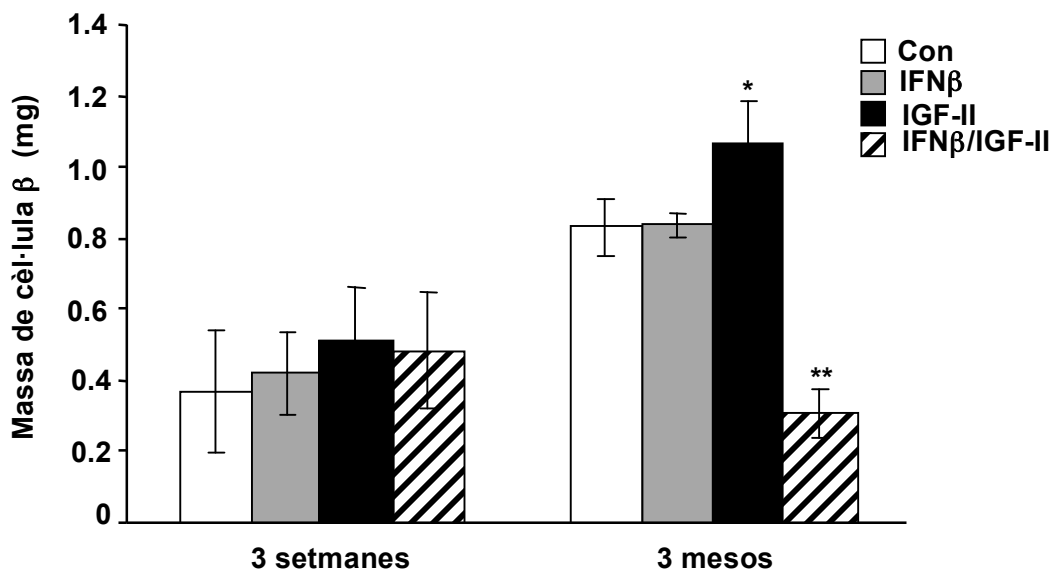


Figura 30. Determinació de la massa de cèl·lula β . Es va determinar la massa de cèl·lula β pancreàtica dels ratolins control, transgènics IFN β , transgènics IGF-II i doble transgènics IFN β /IGF-II a les 3 setmanes i als 3 mesos d'edat. La determinació es va dur a terme tal i com s'explica a Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja \pm SEM de 6 animals per grup (* ratolins transgènics IGF-II i doble transgènics IFN β /IGF-II respecte la resta de grups experimentals; * p <0.05, ** p <0.01).

3.3.3. Determinació del grau d'insulitis present en els illots.

A continuació es va estudiar si la pèrdua de massa de cèl·lula β en els ratolins doble transgènics IFN β /IGF-II podia venir donada per la infiltració dels illots per cèl·lules del sistema immunitari. Per tal de realitzar aquest anàlisi s'obtingueren els pàncrees dels diferents animals a analitzar i es va delimitar l'àrea de cèl·lula β amb una tinció immunohistoquímica anti-insulina, contrastada amb hematoxilina. A partir d'aquestes preparacions es va determinar el percentatge d'illots infiltrats de cada animal (Fig. 31). Es va determinar la presència d'insulitis en els pàncrees d'animals control, transgènics IFN β , transgènics IGF-II i doble transgènics IFN β /IGF-II a tres setmanes i a tres mesos d'edat.

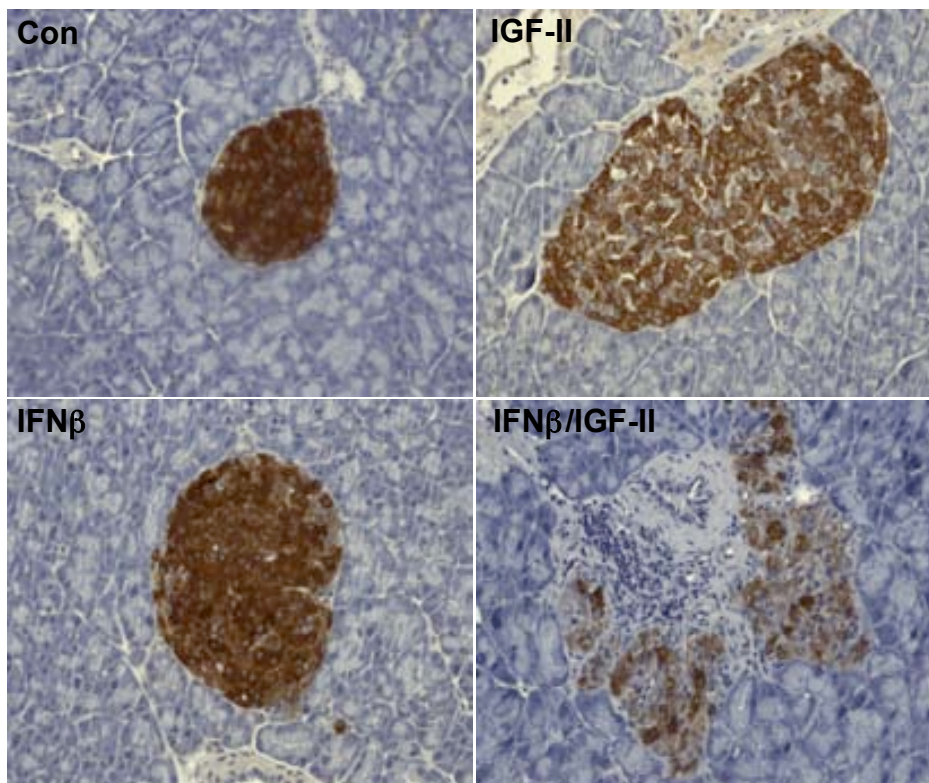


Figura 31. Anàlisi immunohistoquímica del grau d'insulitis. Es realitzaren talls histològics dels pàncrees de ratolins control, transgènics IFN β , transgènics IGF-II i dobles transgènics IFN β /IGF-II de tres setmanes i tres mesos d'edat, i s'incubaren amb anticossos anti-insulina, es contrastaren amb hematoxilina i s'analitzà el percentatge d'illots infiltrats, tal i com s'indica a Materials i Mètodes. En la figura es mostra uns exemples d'algunes de les preparacions d'animals a 3 setmanes d'edat. Ampliació x400.

Quan s'analitzaren els pàncrees dels diferents animals s'observà que, els ratolins control i transgènics IGF-II no presentaven infiltració limfocitària en cap de les edats analitzades. Els ratolins transgènics IFN β presentaven una petita infiltració limfocitària a les 3 setmanes i aquesta incrementava als 3 mesos. La infiltració limfocitària ja s'havia descrit anteriorment en aquests

animals transgènics en fons genètic CD1 (Casellas, 2006); vam comprovar que també es donava en aquest fons genètic 50% C57BL/6;SJL - 50% CD1, tot i que de forma molt menor degut a que la soca C57BL/6;SJL és molt resistent a desenvolupar insulinitis. Els ratolins doble transgènics presentaven també una infiltració limfocitària a les 3 setmanes d'edat, superior a la que presentaven els ratolins IFN β . Als 3 mesos d'edat aquesta infiltració dels animals doble transgènics era menor però encara present (Fig. 32). Així doncs, la pèrdua de massa de cèl·lules \square en els ratolins IFN \square /IGF-II, coincidia amb una forta infiltració limfocitària dels seus illots pancreàtics.

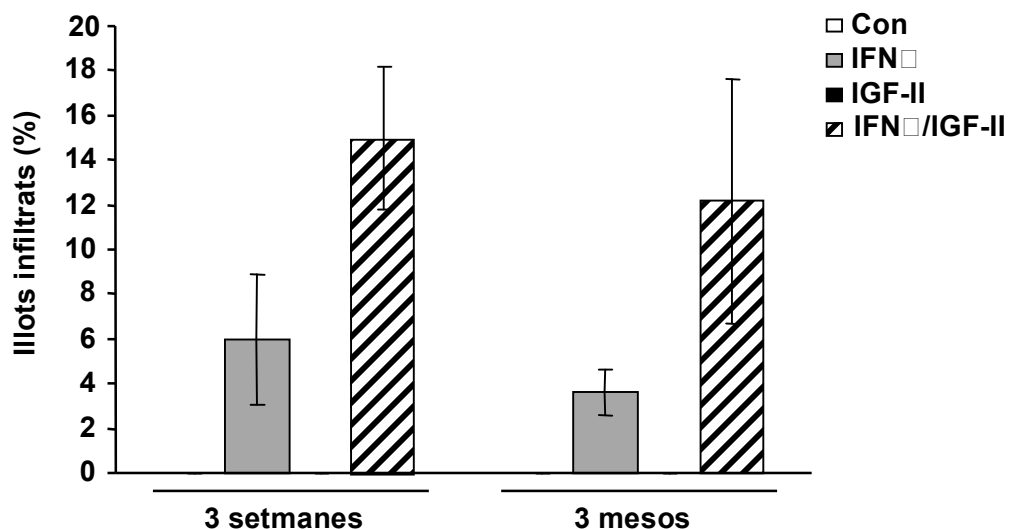


Figura 32. Anàlisi del percentatge d'illots infiltrats en animals de tres setmanes i 3 mesos d'edat. A partir de les preparacions representades en la figura anterior, s'analitzà el percentatge d'illots infiltrats que presentaven cada un dels grups experimentals a 3 setmanes i a tres mesos d'edat. Els resultats són la mitja \pm SEM de: 5 animals control, 10 animals IFN β , 5 animals IGF-II i 15 animals IFN β /IGF-II.

3.3.4. Anàlisi dels nivells d'expressió de les molècules de MHC de classe I i II en ratolins doble transgènics IFN β /IGF-II.

Els ratolins doble transgènics provenen del creuament de ratolins transgènics RIP/IGF-II amb ratolins RIP/hIFN β . En els ratolins transgènics IGF-II s'havia observat un increment en els nivells d'expressió de les molècules de MHC de tant de classe I, com de classe II. S'ha descrit, que els illots dels animals transgènics RIP/hIFN β presenten també un increment significatiu dels nivells de β_2 -microglobulina (Alba, 2004; Casellas, 2006). A continuació es va estudiar si aquest increment, en els nivells d'expressió d'ambdues molècules de MHC, es donaven també en els illots dels ratolins doble transgènics IFN β /IGF-II. La valoració dels nivells d'expressió d'aquests gens es va realitzar mitjançant *Q-PCR* de cDNA procedent de pàncrees de ratolins control, transgènics IFN β , transgènics IGF-II i doble transgènics IFN β /IGF-II de 3 setmanes d'edat.

S'observà que, tal i com s'havia descrit en els IFN β en fons genètic CD1, els pàncrees dels animals transgènics IFN β (50% C57BL/6;SJL - 50% CD1) presentaven també un increment significatiu de l'expressió de β_2 -microglobulina. Aquest major expressió també es detectava en els ratolins doble transgènics IFN β /IGF-II. En els ratolins transgènics IGF-II es detectava un lleuger increment de l'expressió de β_2 -microglobulina, tal i com s'havia observat en fons genètic C57BL/6;SJL (Fig. 33A). Pel que fa els nivells d'expressió de MHC de classe II, s'observà un increment tant en els ratolins transgènics IGF-II com en els doble transgènics IFN β /IGF-II (Fig. 33B).

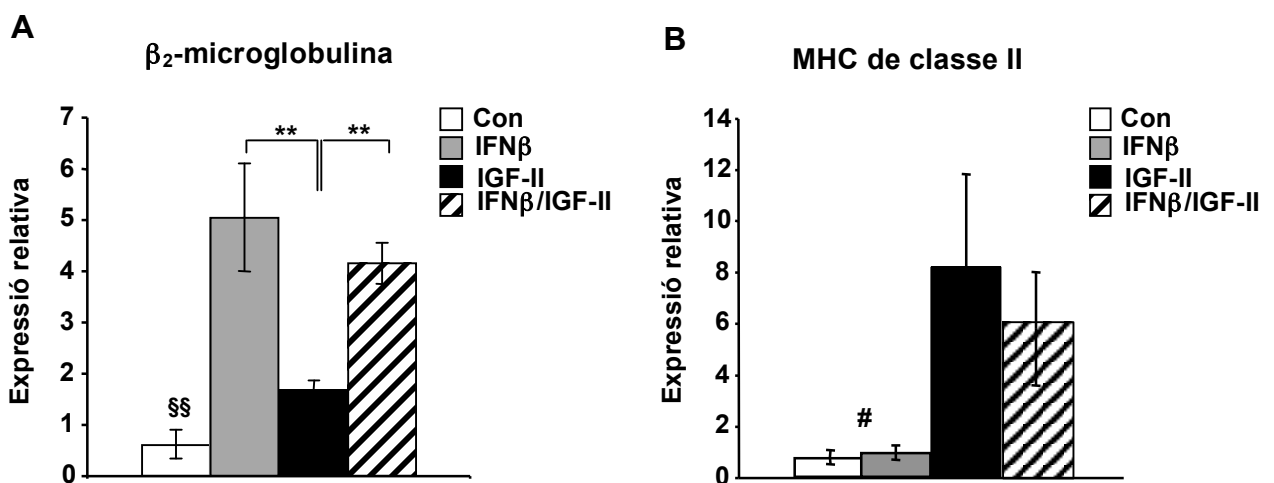


Figura 33. Determinació dels nivells d'expressió de β_2 -microglobulina i MHC de classe II. Els nivells d'expressió de β_2 -microglobulina (A) i MHC de classe II (B) es determinaren per Q-PCR a partir d'extractes de pàncrees d'animals control, transgènics IFN β , transgènics IGF-II i doble transgènics IFN β /IGF-II de 3 setmanes d'edat. Es va realitzar tal i com s'indica a Materials i Mètodes. Els resultats són la mitja \pm SEM de 3 experiments independents (§ ratolins control vs. la resta de grups experimentals; # ratolins control i transgènics IFN β respecte els transgènics IGF-II i doble transgènics IFN β /IGF-II; # p<0.05, §§ p<0.01; **p<0.01).

Així doncs, les alteracions induïdes a nivell de les cèl·lules β pancreàtiques per la sobreexpressió de IGF-II, en presència d'una infiltració limfocitària, acaben desencadenant el desenvolupament de diabetis oberta de forma espontània en els dos primers mesos de vida. Hem pogut comprovar doncs, que aquestes alteracions donaven lloc a una major susceptibilitat a desenvolupar diabetis oberta en presència d'un factor accelerador, com és el cas d'un atac autoimmunitari.

Animals que inicialment s'havien descrit com a pre-diabètics tipus 2, en presència d'una infiltració limfocitària acabaven desencadenant un procés diabètic obert, similar al descrit com a tipus 1. Això estaria d'acord amb la teoria que certs grups suggereixen, en realitat la diferència entre diabetis tipus 1 i diabetis tipus 2 no estaria tant clara, i dependria sobretot dels factors ambientals que intervenen i desencadenen el procés.

V. DISCUSSIÓ

La diabetis tipus 2 es caracteritza per una resistència a la insulina acompanyada d'un defecte en la secreció de la hormona per part de les cèl·lules β . Les causes que indueixen a desenvolupar diabetis tipus 2 són encara desconegudes. Factors genètics, tot i que no es coneixen bé, conjuntament amb factors ambientals, condueixen a una disfunció de la cèl·lula β que no pot alliberar d'una forma regulada la insulina en resposta a glucosa. En alguns casos però, aquesta disfunció i intent de compensació de la resistència, acaba donant una inactivació i apoptosi de les cèl·lules β , i per tant, pacients que inicialment s'havien descrit com a diabètics tipus 2, poden acabar sent també insulino-dependents. Així doncs, resulta d'enorme interès l'estudi de les alteracions presents en les cèl·lules β durant el procés diabètic, per tal de poder trobar els mecanismes i les causes que condueixen a la diabetis oberta.

En el nostre laboratori s'havien generat ratolins transgènics que sobreexpressen el factor de creixement IGF-II específicament en les cèl·lules β pancreàtiques (ratolins RIP/IGF-II) (Devedjian, 2000). Aquests animals presenten una sèrie d'alteracions fenotípiques característiques d'un estat pre-diabètic: lleugera hiperglucèmia, hiperinsulinèmia, intolerància a la glucosa, i una sèrie d'alteracions a nivell de morfologia i d'organització dels illots pancreàtics, molt similars a les presents en alguns animals models de diabetis tipus 2, com poden ser les rates ZDF, les rates GK o els ratolins NZO (Tokuyama, 1995; Hoog, 1996; Chankiewitz, 2006). Tot i així, amb l'edat, aquests animals desenvolupen resistència a la insulina, però no diabetis oberta. Per tant, aquests transgènics resultaven ser un bon model per estudiar les alteracions que es donen durant un estat pre-diabètic. Així doncs, un dels objectius del nostre estudi vas ser caracteritzar les cèl·lules β d'aquests ratolins per tal de trobar quines eren les alteracions presents en aquestes cèl·lules que podrien ser claus pel desenvolupament de diabetis.

La funció principal de les cèl·lules β és el control de la glucèmia de l'organisme, mitjançant la biosíntesi i secreció d'insulina en resposta a la sobrecàrrega de glucosa. En primer lloc es va comprovar si les cèl·lules β dels ratolins transgènics IGF-II eren capaces de respondre correctament a la sobrecàrrega de glucosa. Tal i com Devedjian *et al.* havien descrit, els ratolins transgènics IGF-II presenten, ja als dos mesos d'edat, una marcada intolerància a la glucosa (Devedjian, 2000). Es va poder demostrar però, que aquesta intolerància era deguda a una disminució en la secreció d'insulina en resposta a glucosa. La secreció d'insulina en resposta a aquest sucre és bifàsica (Kahn, 2001). En els animals transgènics IGF-II s'observaven tots dos pics de secreció, però eren menors en comparació amb els que presentaven en els seus germans control. La disminució de la secreció d'insulina en resposta a glucosa és característica dels individus en fases inicials de la diabetis tipus 2 (Bruce, 1988; Kahn, 2001).

La disminució en la secreció d'insulina en resposta a glucosa podria donar-se per alteracions en diferents punts del procés: alteracions en la captació de la glucosa, en la síntesi de la insulina o bé a nivell de la secreció de la hormona. Per tal de determinar quines eren les alteracions que donaven lloc a aquesta disminució en els ratolins IGF-II, vam comprovar l'expressió d'algunes de les proteïnes implicades en el procés de captació de la glucosa i de la secreció d'insulina en els illots pancreàtics aquests animals. Els ratolins IGF-II presentaven una reducció molt important de l'expressió del transportador de glucosa Glut2, i en canvi, no presentaven variacions significatives dels nivells de l'enzim glucoquinasa. Totes dues proteïnes constitueixen l'anomenat *sensor de la glucosa* en les cèl·lules β , ja que d'elles dues depèn, en gran part, el flux d'entrada de glucosa en aquestes cèl·lules i per tant, la posterior secreció d'insulina en resposta a aquesta entrada (Bell, 2001; Pickup & Williams, 2003). La disminució en els nivells de Glut2 no es veia compensada per un increment en l'expressió d'algun altre transportador, com per exemple Glut1. S'ha descrit que en ratolins *knock-out* per Glut2 (Glut2^{-/-}), la manca d'expressió d'aquest transportador no es veu tampoc compensada per un increment en l'expressió de Glut1 ni de Glut3, i no afecta tampoc als nivells d'expressió de l'enzim glucoquinasa (Guillam, 1997).

La disminució en l'expressió de Glut2 s'ha identificat en diferents models animals de diabetis. En models de diabetis tipus 1 com són les rates BB o els ratolins NOD, aquesta disminució s'ha descrit en estadis inicials de la patologia, previs a l'aparició d'hiperglucèmia (Orci, 1990a; Reddy, 1998). De manera similar, la disminució de Glut2 també precedeix el desenvolupament de diabetis oberta en varis models de diabetis tipus 2, com per exemple els ratolins db/db (Thorens, 1992), les rates ZDF (Orci, 1990b; Johnson, 1990), les rates GK (Orci, 1990b) o els ratolins NZO (Chankiewicz, 2006). La disminució de l'expressió de Glut2 seria doncs, una característica comuna entre els individus amb diabetis tipus 1 i tipus 2, i a la vegada, suposaria una possible alteració que podria agreujar el procés diabètic tipus 2, donat que impediria a les cèl·lules β incrementar la secreció de manera suficient com per compensar la resistència a la insulina (Orci, 1990b). De manera similar, en els ratolins transgènics RIP/IGF-II, la disminució de Glut2 podria suposar una alteració que induiria també una major susceptibilitat a desenvolupar diabetis.

Es va comprovar que en els ratolins IGF-II la disminució dels nivells d'expressió de Glut2 era una alteració present ja en els illots dels ratolins d'un dia de vida, sent prèvia per tant, al desenvolupament d'hiperglucèmia. Certs estudis afirmen que la disminució de Glut2 podria ser l'alteració causant de la hiperglucèmia diabètica (Unger, 1991; Chankiewicz, 2006). Aquesta pèrdua doncs, podria ser també una explicació de la lleugera hiperglucèmia observada en els transgènics IGF-II.

Un cop estudiades les alteracions presents en el procés de captació de la glucosa, es van estudiar alguna de les proteïnes implicades en el procés de secreció d'insulina. S'analitzaren els nivells d'expressió de Kir6.2 i SUR1, els dos components dels canals de potassi dependents d'ATP, importants en la secreció d'insulina. Es va observar que els ratolins transgènics presentaven una tendència a expressar nivells lleugerament inferiors dels dos components, especialment de Kir6.2, tot i que les diferències no eren estadísticament significatives en cap dels dos casos.

Per tal de poder determinar quins eren els mecanismes pels quals s'indueïen tots aquests canvis, es va realitzar un estudi comparatiu dels illots dels ratolins transgènics IGF-II vs. els dels ratolins control, mitjançant la tecnologia de *microarrays* de DNA. Aquest estudi ens permetria trobar tant les possibles causes que acaben donant lloc a les alteracions descrites fins ara, com altres alteracions que poguessin estar també implicades en el desenvolupament de l'estat pre-diabètic en aquests animals. L'estudi de *microarrays* va donar lloc a un total de 544 gens alterats de forma estadísticament significativa, 69 era per un increment de la seva expressió, i els 475 restants era per una disminució. Segons la classificació del *Gene Ontology* (GO) (www.geneontology.org) la majoria dels gens que presentaven un increment en la seva expressió eren gens involucrats amb la matriu extracel·lular, molècules d'adhesió, inflamació i resposta immune. Segons aquesta mateixa classificació en el grup de gens que presentaven una disminució en l'expressió hi trobàvem principalment gens relacionats amb el metabolisme cel·lular: factors de transcripció, cadena de transport d'electrons, transport i cicle cel·lular.

En general s'observava una disminució important de diversos gens involucrats en el transport a la membrana. Les cèl·lules β dels ratolins IGF-II presentaven una disminució dels nivells d'expressió de diversos transportadors de carbohidrats i transportadors d'ions, com per exemple fosfats, clor, bicarbonat (HCO_3^-) o potassi. Per tant, en aquestes cèl·lules semblava que no només estaria afectada l'entrada de glucosa sinó també l'entrada d'altres carbohidrats i sobretot l'intercanvi d'ions, la majoria d'ells de gran importància per moltes funcions cel·lulars. De manera similar, un altre grup de gens que presentaven una disminució significativa en els illots dels ratolins IGF-II, eren alguns gens pertanyents a la cadena de transport d'electrons. La producció d'ATP mitjançant aquesta cadena mitocondrial és important, ja que les variacions dels nivells d'ATP regulen múltiples processos cel·lulars, inclosa la secreció d'insulina. Així doncs, alteracions en els processos de producció d'ATP podrien influir també en la disminució de la secreció d'insulina observada en els ratolins transgènics IGF-II.

S'observaven també alteracions en un grup de gens implicats en la transducció de senyals. Dins d'aquest grup es trobaven disminuïts alguns gens implicats en les cascades de senyalització intracel·lular, com per exemple la via de les MAPK i la via d'AKT. En canvi s'observava un increment de la *Phospholipase C epsilon 1*, enzim que forma part del metabolisme de l'inositol-trifosfat (IP₃) i està involucrat també en la via de senyalització de la insulina. Es detectava també un augment, d'unes quatre vegades, de l'*Angiotensin receptor like*, s'ha descrit que la unió d'aquest receptor amb el seu lligant (apelina) inhibeix la secreció d'insulina (Sorhede, 2005). En canvi, s'observava una disminució important del factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF), essencial per la vascularització i correcta funció dels illots pancreàtics (Brissova, 2006). En els resultats dels *microarrays*, es va confirmar també la sobreexpressió d'IGF-II induïda pel transgen.

Dins del grup de gens classificats com a unió a DNA es va observar una marcada disminució de tres factors de transcripció: Isl1, Pdx1 i FoxA2 (també anomenat HNF3β). Tots tres estan implicats, tant en el desenvolupament i diferenciació embrionària del pàncrees, com en la regulació de la transcripció de gens importants pel funcionament de les cèl·lules β en l'individu adult (Sander & German, 1997; Yamaoka, 1999; Edlund, 2001). Els dos últims, Pdx1 i HNF3β, regulen directament l'expressió de gens implicats en els processos de captació de glucosa i secreció d'insulina. La disminució de tots dos gens en les cèl·lules β dels ratolins RIP/IGF-II es recomprova mitjançant *Q-PCR*.

El factor de transcripció Pdx-1 actua regulant la transcripció de diferents gens com són: el de la insulina (Ohlsson, 1991), el transportador de glucosa GLUT2 (Waeber, 1996), l'IAPP (*islet amyloid polypeptide*) (Watada, 1996a), la glucoquinasa (Watada, 1996b) i el factor de transcripció Nkx6.1 (Shih, 2002), entre altres (Esquema 1, pàgina 85). La disminució de Pdx1 podria doncs, estar relacionada amb la pèrdua de GLUT2 i la disminució de l'expressió d'insulina, observades en els ratolins IGF-II. De manera similar al que nosaltres observàvem en els ratolins transgènics IGF-II, els ratolins deficients per Pdx1, en heterozigosi (ratolins Pdx1^{+/-}), presenten una marcada intolerància a la glucosa. Aquesta intolerància dels ratolins Pdx1^{+/-} s'ha relacionat amb una disminució en la secreció d'insulina en resposta a glucosa, i s'ha descrit que podria venir donada per diferents motius. En primer lloc per la disminució d'aproximadament el 55-68% dels nivells de Glut2, i en segon lloc per l'alteració en diferents gens implicats en processos com la cadena respiratòria mitocondrial o la mobilització de Ca²⁺ intracel·lular (Jonsson, 1994; Offield, 1996; Brissova, 2002; Gauthier, 2004). L'alteració en els nivells de Pdx1 s'ha confirmat en diversos individus amb diabetis tipus 2 (Brissova, 2002), i certs estudis demostren que, una menor expressió de Pdx1, tot i no ser suficient per donar lloc a diabetis, sí que implica un risc important

de desenvolupar-la, ja que aquesta alteració, en combinació amb altres factors genètics o ambientals poden desencadenar el procés (Brissova, 2005; Kulkarni, 2004).

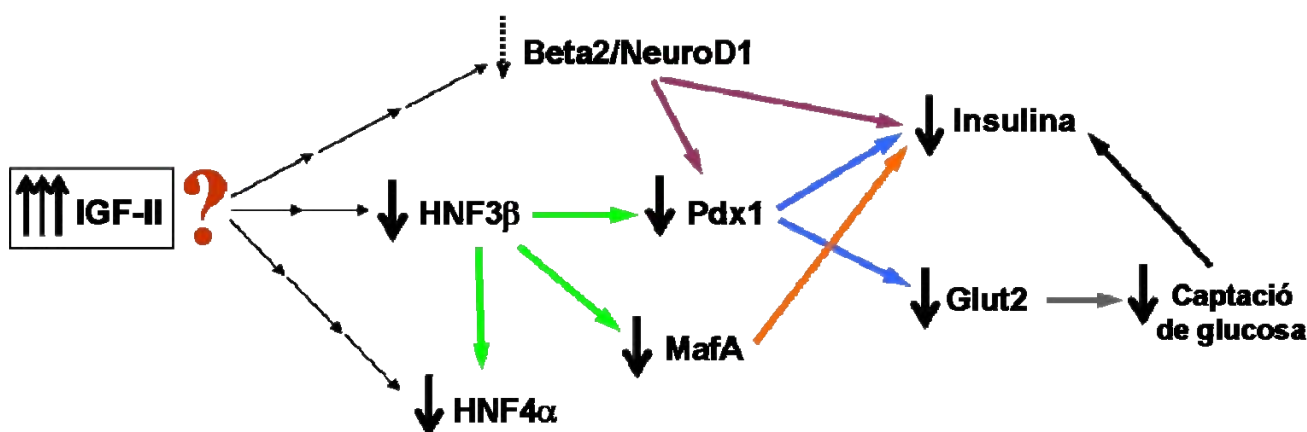
L'expressió del gen de Pdx1 ve regulada per la interacció de diferents factors de transcripció, com són per exemple: Beta2/NeuroD1, HNF1 α i HNF3 β (Wu, 1997; Gerrish, 2000; Ben-Shushan, 2001; Lee, 2002) (Esquema 1). En illots dels ratolins transgènics IGF-II s'havia observat que d'aquests tres factors, només HNF3 β presentava una disminució significativa dels seus nivells d'expressió. La disminució d'HNF3 β podria ser responsable de la reducció dels nivells de Pdx1 detectada en les cèl·lules β dels ratolins IGF-II. Així, s'ha descrit que ratolins heterozigots doble *knock-out* per Pdx1 i HNF3 β (ratolins Pdx1^{+/-}/Hnf3 β ^{+/-}) presenten una marcada intolerància a la glucosa i empitjoren el fenotip descrit pels ratolins Pdx1^{+/-} (Shih, 2002). Els ratolins Pdx1^{+/-}/Hnf3 β ^{+/-} presenten, a més a més, una estructura dels illots alterada, amb les cèl·lules α distribuïdes per tot l'illot, i no només localitzades a la perifèria d'aquests. Estructura d'altra banda molt similar a la que presenten els illots dels ratolins transgènics RIP/IGF-II. En el cas dels ratolins Pdx1^{+/-}/Hnf3 β ^{+/-}, aquesta alteració en la morfologia dels illots l'associen a una disminució dels nivells d'E-cadherina (Shih, 2002), disminució també present els illots dels ratolins transgènics RIP/IGF-II.

El factor de transcripció HNF3 β , a part d'induir l'expressió de Pdx1, regula també la transcripció d'importants factors com HNF4 α , HNF1 α , Nkx6.1 i MafA (Wilson, 2003; Raum, 2006), i les subunitats Kir6.2 i SUR1 dels canals de potassi dependents d'ATP (Sund, 2001; Lantz, 2004) (Esquema 1). La disminució de l'expressió de HNF3 β , observada en els illots dels ratolins IGF-II, a part d'estar d'acord amb disminució de Pdx1, podria explicar també, les petites variacions observades en l'expressió de Kir6.2 i SUR1. De la resta de gens que s'ha descrit que poden estar regulats per HNF3 β , únicament els nivells de HNF4 α i MafA presentaven també una disminució significativa en els illots dels ratolins transgènics. A nivell hepàtic s'ha descrit que HNF3 β pot ser inhibit directament per la senyalització de la insulina, a través de l'acció de la quinasa Akt. La fosforil·lació d'HNF3 β per Akt, donaria lloc a la seva exclusió del nucli i inhibició de la seva activitat transcripcional (Wolfrum, 2004; Puigserver, 2006). Aquesta via però, s'ha descrit únicament a nivell de fetge, i no a nivell dels illots pancreàtics (Kulkarni & Kahn, 2004). En el cas que aquesta senyalització es donés també en els illots pancreàtics, la sobreexpressió d'IGF-II en les cèl·lules β dels ratolins transgènics podria inhibir HNF3 β a través de la via d'activació d'Akt.

Els illots d'IGF-II presentaven una disminució dels nivells d'HNF4 α . Alguns estudis demostren que una menor expressió d'aquest factor podria estar relacionada amb l'alteració funcional de les cèl·lules β i el desenvolupament de diabetis tipus 2 (Oxombre, 2002; Odom, 2004; Kulkarni & Kahn, 2004).

L'altre factor que s'havia trobat disminuït en els illots dels ratolins IGF-II, és MafA. Aquest és un dels elements més importants de regulació de l'expressió del gen de la insulina en resposta a glucosa (Kataoka, 2002; Olbrot, 2002; Matsuoka, 2004; Wang, 2007). De forma similar al que s'observa en els ratolins transgènics IGF-II, els ratolins *knock-out* per MafA (MafA^{-/-}) presenten alteracions en la morfologia dels illots, disminució de l'expressió d'insulina, de Pdx1, NeuroD1 i Glut2 i intolerància a la glucosa deguda a una disminució en la secreció d'insulina. Aquests *knock-outs* però, acaben desenvolupant diabetis (Zhang, 2005). La regulació de la transcripció de MafA ve donada per diferents factors de transcripció: HNF3β, Pdx1 i Nkx2.2 (Raum, 2006). La disminució d'HNF3β i Pdx1, podria ser una possible causa de la disminució de MafA en les cèl·lules β dels ratolins IGF-II. Alteracions en els nivells d'expressió d'aquest factor s'han relacionat també amb la disfunció de les cèl·lules β en la diabetis tipus 2 (Harmon, 2005).

L'expressió d'IGF-II en les cèl·lules β d'aquests ratolins transgènics dóna lloc a l'alteració del patró d'expressió de diversos factors que defineixen les cèl·lules β com a tals (Esquema 1). La interacció de tots aquests factors resulta ser crítica per la correcta secreció d'insulina en resposta a glucosa i pel bon funcionament de les cèl·lules β en general.



Esquema 1. Alteracions trobades en les cèl·lules β dels ratolins transgènics RIP/IGF-II en alguns dels principals factors de transcripció importants per la funcionalitat de les cèl·lules β pancreàtiques. Les fletxes (↓) indiquen disminució de l'expressió d'aquests gens en els illots dels ratolins IGF-II.

Alteracions similars, a nivell dels factors de transcripció de les cèl·lules β, s'han descrit que també es donen durant les diferents etapes de disfunció de la cèl·lula β al llarg del procés diabètic, i són també presents en múltiples models animals de diabetis tipus 2 (Tokuyama, 1995; Hoog, 1996; Chankiewicz, 2006), en pacients humans diabètics tipus 2 (Gunton, 2005), i en cèl·lules β sotmeses a estrès oxidatiu, a glucotoxicitat o a lipotoxicitat (Robertson, 2006; Jonas, 1999; Laybutt, 2002; Maedler, 2002).

A part de les alteracions descrites a nivell de la funcionalitat de les cèl·lules β , els illots dels ratolins RIP/IGF-II presentaven també alteracions en diversos gens relacionats amb la matriu extracel·lular i molècules d'adhesió. En general s'observava un increment de components de la matriu extracel·lular, implicats en la formació de la matriu, migració i adhesió cèl·lula-matriu, com per exemple algunes molècules de pro-col·lagen, *syndecan 4* o *tensin* entre altres. No obstant, quan s'analitzà l'expressió de col·lagen IV mitjançant immunohistoquímica, no s'observaren diferències entre els illots control i els transgènics. Tot i l'increment d'aquestes proteïnes de matriu, s'observava en canvi, una disminució de les proteïnes implicades en la adhesió cèl·lula-cèl·lula, com per exemple la E-cadherina. S'ha descrit que aquesta molècula d'adhesió és important pel manteniment de les adhesions entre les diferents cèl·lules de l'illot, i que la pèrdua d'aquestes adhesions pot donar lloc tant a alteracions en l'organització dels illots, com en la funcionalitat de les pròpies cèl·lules β (Dahl, 1996; Hauge-Evans, 1999). La pèrdua d'E-cadherina i d'altres molècules d'adhesió intracel·lular podria estar relacionada amb la desorganització en la distribució de les cèl·lules α i β observada en els illots dels ratolins IGF-II.

Un altre dels gens que presentava un elevat increment en els illots dels ratolins transgènics era el *IA-a2*. Aquest gen codifica per la cadena α del complex major d'histocompatibilitat de classe II (MHC-II). L'increment observat en els *microarrays* es va confirmar mitjançant *Q-PCR*. L'expressió de MHC de classe II es restringeix a les cèl·lules presentadores d'antígens (APC) del sistema immunitari, com poden ser macròfags, cèl·lules dendrítiques, limfòcits B i limfòcits T. Aquesta molècula de MHC de classe II és reconeguda per les cèl·lules T CD4⁺, donant lloc a la seva posterior activació (Abbas, 1995). Es va comprovar, que els ratolins RIP/IGF-II no presenten infiltració limfocitària en els seus illots, donat que es troben en un fons genètic C57BL/6;SJL, molt resistent a desenvolupar insulinitis (Rossini, 1977). Així doncs, la hiperexpressió de molècules de MHC-II en els illots d'aquests animals no podia explicar-se per una major presència de cèl·lules dels sistema immunitari. L'increment d'expressió de molècules de MHC-II en les cèl·lules β s'ha descrit en casos de diabetis tipus 1: en cèl·lules β de pacients diabètics, de rates BB i ratolins NOD (Foulis, 1986; Dean, 1985; Hanafusa, 1987), i fins i tot s'ha suggerit que podria ser una alteració amb un important paper inductor en la destrucció autoimmunitària de les cèl·lules β durant la diabetis tipus 1. No obstant, també s'ha descrit en algun model de diabetis tipus 2, com per exemple les rates GK (Homo-Delarche, 2006). Aquestes rates presenten també nivells elevats d'IGF-II en els seus illots i unes alteracions morfològiques i funcionals molt similars a les dels ratolins transgènics RIP/IGF-II (Höög, 1996). S'ha descrit que l'expressió ectòpica de MHC-II, és a dir, en cèl·lules que no són APCs, es dona per un increment en els nivells d'expressió de la isoforma IV del seu transactivador (CIITApIV) (Harris, 2006). No obstant, no s'observaren diferències en els nivells d'aquest transactivador entre els illots dels ratolins control i ratolins transgènics.

També s'han descrit diversos animals transgènics que sobreexpressen molècules MHC-II a nivell de les cèl·lules β pancreàtiques. L'expressió de les molècules I-A i I-E (homòlogues a la molècula HLA humana), sota el control del promotor de la insulina dóna lloc a la inducció de diabetis, però, de manera similar que als illots dels ratolins transgènics IGF-II, en cap dels dos casos s'observa infiltració limfocitària ni cap evidència de resposta immune en els pàncrees d'aquests animals (Sarvetnick, 1998; Lo, 1988). L'expressió de MHC-II a les cèl·lules β sota un promotor més feble que el de la insulina, i que per tant, dóna nivells de sobreexpressió més baixos, no dóna lloc ni a infiltració limfocitària ni al desenvolupament de diabetis (Böhme, 1989). Estudis posteriors, també demostren la importància dels nivells d'expressió d'aquestes molècules per induir diabetis, i que un nivell crític d'expressió seria necessari perquè es donés l'aparició de la malaltia (Allison, 1990). No obstant, no només són importants els nivells d'expressió dels MHC-II, sinó també la presència de molècules co-estimuladores necessàries per la correcta activació dels limfòcits T (Kim, 2002). Els nivells d'expressió i la manca de molècules co-estimuladores, podrien ser doncs una possible explicació de perquè els ratolins RIP/IGF-II, tot i presentar hiperexpressió de MHC-II, no desenvolupen diabetis oberta.

A part de les alteracions descrites en els nivells de MHC de classe II, s'observà que les cèl·lules β dels ratolins transgènics IGF-II també presentaven un increment en els nivells de MHC de classe I. Es va comprovar que totes aquestes alteracions eren degudes a l'efecte local del gen quimèric a nivell de pàncrees i no a un efecte d'aquest a nivell de timus. Alguns models transgènics que sobreexpressen molècules de MHC-I en les cèl·lules β pancreàtiques desenvolupen diabetis però sense presentar infiltrat limfocitari ni resposta immune en els seus illots (Allison, 1988). En canvi, en altres models on l'increment d'expressió de β_2 -microglobulina és inferior al descrit en el model anterior, s'observa insulitis en els illots però absència de diabetis oberta (Pelegrin, 1998).

Així doncs, l'expressió d'IGF-II en les cèl·lules β d'aquests ratolins transgènics donava lloc a una sèrie d'alteracions que podrien contribuir a que els ratolins RIP/IGF-II desenvolupin un estadi de pre-diabetis. S'ha descrit que les alteracions en la funcionalitat de les cèl·lules β serien un component clau en el desenvolupament de diabetis tipus 2, i no una simple conseqüència de la patologia (Kahn, 2003; Marchetti, 2006). Certs grups postulen que factors ambientals que provoquessin la disfunció de les cèl·lules β , acabarien accelerant també el procés diabètic (Wilkin, 2001; Mathis, 2001; Donath, 2003; Mandrup-Poulsen, 2003). Aquests mateixos grups, suggereixen que el nexa entre la diabetis tipus 1 i la tipus 2 seria la mort de les cèl·lules β . En tots dos casos factors ambientals actuarien com a factors acceleradors en individus genèticament susceptibles. En el cas de la diabetis tipus 1 aquests factors serien la dieta, infeccions víriques,

estrès o certs antibiòtics; i en el de la diabetis tipus 2 serien per exemple la obesitat, l'estrès o el sedentarisme (Wilkin, 2001).

Donat que moltes de les alteracions descrites en les cèl·lules β dels ratolins RIP/IGF-II, són pròpies d'un estat pre-diabètic tipus 2, vam estudiar si aquestes podrien fer que els ratolins transgènics fossin més vulnerables a desenvolupar diabetis oberta en front a un estímul que actués com a factor accelerador. En estudis previs s'havia descrit que l'alimentació d'aquests animals amb una dieta alta en lípids, que també seria un possible factor accelerador, donava lloc al desenvolupament de diabetis oberta a un 30% dels ratolins transgènics IGF-II (Devedjian, 2000). En aquest treball però, es van utilitzar factors que actuessin específicament sobre les cèl·lules β pancreàtiques. És per això que vam escollir en primer lloc el tractament amb estreptozotocina (STZ), que simularia un efecte tòxic i més específic per les cèl·lules β . En segon lloc, es va examinar l'efecte d'un procés autoimmune, que seria un factor més crònic i més propi de la patologia diabètica.

En plantejar-nos però, el tractament amb STZ, calia tenir en compte, que el factor de creixement IGF-II és un potent antiapoptòtic, i que a més, és capaç d'induir *in vitro* la proliferació i la diferenciació de les cèl·lules β , i està també involucrat en el creixement i la diferenciació dels illots durant el desenvolupament embrionari (Hill, 2000; Rabinovitch, 1982; Hogg, 1993). A més a més, IGF-II és a nivell estructural i funcional molt similar al factor de creixement IGF-I (Daughaday, 1989). Degut a les similituds existents entre aquests dos factors, podia donar-se el cas que l'expressió local d'IGF-II a nivell de les cèl·lules β bloquejés l'efecte del tractament amb STZ, tal i com s'ha descrit que succeeix en els animals transgènics RIP/IGF-I que expressen IGF-I a les cèl·lules β del pàncrees (George, 2002).

Després del tractament amb 40 mg/Kg de STZ, tant els animals control, com els transgènics RIP/IGF-II desenvoluparen diabetis oberta. Ambdós grups presentaven una disminució en la massa de cèl·lules β , que donava lloc a la hipoinsulinèmia i la conseqüent hiperglucèmia diabètica. Tot i que els ratolins transgènics IGF-II partien d'una massa de cèl·lules β tres vegades superior a la dels ratolins control, després del tractament amb STZ, no s'observaren diferències entre la massa de cèl·lules β dels dos grups, és a dir que la pèrdua de massa de cèl·lules β era superior en el cas dels ratolins transgènics IGF-II. El manteniment de la massa de cèl·lula β depèn de l'equilibri entre l'apoptosi, la replicació i la neogènesi d'aquestes cèl·lules. S'ha descrit que el pic d'apoptosi es dona a dia 10 després de tractament amb *MLD STZ* (Like, 1977; O'Brien, 1996). Degut a aquest increment en l'apoptosi, s'indueix també la replicació de les cèl·lules β com a mecanisme per compensar aquesta pèrdua de cèl·lules. Tot i les propietats antiapoptòtiques i mitogèniques descrites per IGF-II, la sobreexpressió d'aquest factor en les

cèl·lules β d'aquests ratolins transgènics no donava lloc ni a una disminució de l'apoptosi d'aquestes cèl·lules, ni a un increment en la replicació abans ni després del tractament. Els resultats indicaven doncs que els animals transgènics IGF-II responien al tòxic igual que ho feien els ratolins control i desenvolupaven diabetis oberta. No obstant, els ratolins IGF-II semblaven presentar una major sensibilitat al tractament, ja que en ells la pèrdua de massa de cèl·lules β i la disminució dels nivells d'insulina després del tractament era superior que en els controls.

Tot i les similituds descrites entre els factors de creixement IGF-I i IGF-II, els animals transgènics RIP/IGF-II responien al tractament amb STZ de forma totalment oposada al que ho feien els ratolins transgènics RIP/IGF-I (George, 2002). S'ha descrit que els efectes mitogènics i antiapoptòtics d'IGF-I i IGF-II vénen mediats sobretot a través del receptor d'IGF-I (IGF-IR) (Le Roith, 1997). Tots dos factors s'uneixen tant al receptor d'IGF-I (IGF-IR) com al receptor d'insulina (IR), però no ho fan amb la mateixa afinitat. El receptor IGF-IR té una afinitat 10 vegades superior per IGF-I, que per IGF-II (Le Roith, 1997). Una major afinitat d'IGF-I per aquest receptor podria explicar el major efecte observat en els animals transgènics RIP/IGF-I. Ambdós factors poden unir-se també al receptor d'insulina (IR). Aquest receptor existeix en dues isoformes, la IR-A uneix amb molta més afinitat IGF-II que no pas IGF-I (Moller, 1989). A part, l'IGF-II s'uneix amb una elevada afinitat al receptor IGF-II/M6P. No obstant, s'ha postulat que la funció principal d'aquest receptor és l'eliminació d'IGF-II del sèrum i la seva posterior degradació (Hawkes, 2004) i, la seva participació en la mediació d'accions biològiques és controvertida (Zhang, 1997; Hawkes, 2004). Les diferents afinitats d'IGF-I i IGF-II pel diferents receptors (IR, IGF-IR, IGF-II/M6P) podria explicar en part les diferències observades entre els ratolins RIP/IGF-I i RIP/IGF-II després del tractament amb *MLD STZ*.

També és important tenir en compte, que l'expressió d'aquests dos gens quimèrics (RIP/IGF-I i RIP/IGF-II) ve dirigida pel promotor de la insulina-I de rata (RIP). Aquest promotor inicia la seva expressió al voltant del dia embrionari e9-9.5. Així doncs, IGF-I i IGF-II s'expressarien a nivells elevats durant tot el desenvolupament embrionari d'aquests animals. Durant aquest període l'IGF-II està implicat en la regulació del creixement i diferenciació dels illots, i és molt més abundant que IGF-I (Han, 1988). Durant el desenvolupament, IGF-II actuaria sobretot a través de la unió amb la isoforma A del receptor de la insulina (IR-A). Isoforma predominant a nivell fetal i la qual presenta molta més afinitat per IGF-II que no pas per IGF-I (Moller, 1989; Denley, 2003). Les diferències a nivell de desenvolupament pancreàtic influencien en les característiques de l'animal adult, i per tant, donen lloc a animals fenotípicament molt diferents. Els animals RIP/IGF-I són normoglicèmics, normoinsulinèmics i no presenten intolerància a la glucosa. En canvi, els ratolins RIP/IGF-II havíem pogut comprovar que presenten múltiples alteracions a nivell de les cèl·lules β pancreàtiques, pròpies d'un estadi de pre-diabetis. Aquestes diferències fenotípiques

poden ser també una raó important dels diferents resultats obtinguts amb els dos animals transgènics.

Per tal de comprovar però, si realment les alteracions descrites en aquests animals, podrien fer-los molt més vulnerables a desenvolupar diabetis, vàrem tractar els animals amb dosis de STZ que no fossin diabetogèniques pels controls. S'ha descrit que els ratolins control tractats amb dosis molt baixes de STZ (20 mg/Kg) són capaços de mantenir la normoglucèmia, i no arriben a desenvolupar diabetis després d'aquest tractament, conegut com a *MVLD STZ* (Casellas, 2006). El tractament amb aquestes dosis de STZ donà lloc al desenvolupament de diabetis oberta a un 42% dels ratolins transgènics IGF-II. Els ratolins control no presentaven variacions ni en la seva glucèmia, ni en la massa de cèl·lula β , en canvi, una part dels ratolins transgènics IGF-II presentaven hiperglucèmia, tant en alimentació com en dejú. Un estudi histològic del pàncrees va permetre comprovar que l'increment en la glucèmia dels ratolins transgènics era deguda a una pèrdua de massa de cèl·lula β . En el cas de la població d'animals transgènics que romanien normoglucèmics durant tot l'estudi, la reducció de la massa de cèl·lula β era d'un 40% aproximadament, en canvi, en la població d'animals transgènics que desenvolupaven hiperglucèmia diabètica, la pèrdua de massa de cèl·lules β arribava a ser del 80%. Tots aquests resultats indicaven que els ratolins transgènics RIP/IGF-II presentaven una major susceptibilitat a desenvolupar diabetis oberta en presència d'un factor accelerador, en aquest cas la STZ.

Similarment, es va determinar si els ratolins transgènics RIP/IGF-II serien més vulnerables a desenvolupar diabetis oberta en presència d'un procés autoimmune, i no únicament en front un efecte tòxic com el tractament amb estreptozotocina. Per tal d'induir un atac immunitari als ratolins RIP/IGF-II, els vàrem creuar amb ratolins RIP/hINF β . S'ha descrit que aquests ratolins RIP/hINF β , en fons genètic CD-1, presenten una important infiltració en els seus illots, principalment cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺ (Alba, 2004, Casellas, 2006). Presenten també un increment de l'expressió de β 2-microglobulina a nivell dels illots pancreàtics, però no de molècules MHC de classe II (Alba, 2004). Aquesta infiltració fa que aquests ratolins presentin característiques pròpies d'un estat pre-diabètic tipus 1, però només un 11% d'aquests animals acaben desenvolupant diabetis espontània. S'ha demostrat que el desenvolupament de diabetis en aquests animals, no és causat per una disfunció metabòlica de les cèl·lules β , sinó que és clarament autoimmune (Alba, 2004). Aquests ratolins RIP/hINF β es creuaren amb els ratolins RIP/IGF-II per tal d'obtenir ratolins doble transgènics INF β /IGF-II. Aquests ratolins doble transgènics presentaven, ja a les 3 setmanes de vida una marcada intolerància a la glucosa, igual que els seus germans IGF-II. Aquesta intolerància possiblement podria venir donada per les

mateixes alteracions que s'havien descrit en els ratolins transgènics RIP/IGF-II, en fons genètic C57BL/6;SJL.

Quan s'analitzaren les glucèmies d'aquests ratolins doble transgènics IFN β /IGF-II, s'observà que aquests desenvolupaven una marcada hiperglucèmia durant els dos primers mesos de vida, arribant a una incidència de diabetis espontània del 75% del animals IFN β /IGF-II als 4 mesos d'edat. Contràriament, els seus germans control i IFN β presentaven normoglucèmia i, els ratolins IGF-II presentaven una lleugera hiperglucèmia. La hiperglucèmia diabètica en els ratolins doble transgènics venia donada per una disminució dels nivells d'insulina circulants. No s'observaren alteracions en els nivells d'insulina dels ratolins control i transgènics IFN β de diferent edats. En el cas dels ratolins transgènics IGF-II s'observava una lleugera hiperinsulinèmia als 3 mesos d'edat, descrita prèviament en els ratolins en fons genètic C57BL/6;SJL. A part de la disminució en els nivells d'insulina circulant dels ratolins doble transgènics IFN β /IGF-II, s'observava també una disminució en els nivells de hIFN β circulants, ja que l'expressió de tots dos transgens ve regulada pel promotor del gen de la insulina-1 (RIP-1).

A les 3 setmanes de vida, tant els ratolins transgènics IGF-II, com els doble transgènics IFN β /IGF-II presentaven una organització de les cèl·lules dels illots totalment alterada. Les cèl·lules α es trobaven distribuïdes aleatòriament per tot l'illot en comptes d'estar a la perifèria. Als 3 mesos, els ratolins IFN β /IGF-II presentaven una pèrdua significativa de massa de cèl·lula β , que podria explicar la disminució observada en els nivells d'insulina i l'aparició de diabetis en aquests ratolins. Als 3 mesos d'edat, els ratolins transgènics IGF-II mostraven un major increment de la massa de cèl·lules β , aquest increment també s'havia descrit en els ratolins transgènics IGF-II en fons genètic C57BL/6;SJL, en aquest cas però, l'increment no resultava ser de 3 vegades, possiblement, perquè, tal i com s'ha descrit, el fons genètic CD-1 és més resistent a generar hiperplàsia dels illots que no pas el fons genètic C57BL/6;SJL. Paral·lelament a la pèrdua de massa de cèl·lula β , en els pàncrees dels ratolins IFN β /IGF-II s'hi observava una important infiltració limfocitària. S'ha descrit que l'expressió d'IFN β en les cèl·lules β indueix una infiltració principalment de limfòcits T CD4⁺ i T CD8⁺, per tant, possiblement en els ratolins IFN β /IGF-II es tracti d'un infiltrat molt similar (Alba, 2004; Casellas, 2006).

Contràriament als resultats obtinguts amb els ratolins IFN β /IGF-II, s'ha descrit que l'expressió d'IGF-I en els ratolins doble transgènics IFN β /IGF-I inhibeix l'aparició d'infiltració limfocitària en els illots (Casellas, 2006). Aquestes diferències entre els doble transgènics IFN β /IGF-I i els IFN β /IGF-II són similars a les que observàvem entre els ratolins RIP/IGF-I i RIP/IGF-II després del tractament amb STZ.

En les cèl·lules β els ratolins RIP/hINF β s'hi havia descrit un increment de l'expressió de β_2 -microglobulina (Pelegrin, 1998; Alba, 2004; Casellas, 2006). En les dels ratolins RIP/IGF-II hi havíem observat un l'increment d'expressió de molècules MHC-II, com també un lleuger increment de β_2 -microglobulina. Es va comprovar que en els ratolins doble transgènics INF β /IGF-II es mantenia la hiperexpressió d'ambdues molècules. S'ha descrit que l'increment de β_2 -microglobulina, donat per la presència d'INF β , és capaç d'induir insulitis i trencar la tolerància envers les cèl·lules β (Notkins, 2001; Alba, 2004). Diversos articles descriuen també, que la presència de MHC-II en els òrgans diana, per si sola no és suficient com per trencar la tolerància, en canvi, en presència d'un nombre suficient de cèl·lules T autoreactives, en aquest cas induïdes per l'expressió d'INF β , si que pot donar lloc al desenvolupament de diabetis (Von Herrath, 1995; Wen, 2000). Així doncs, en el ratolins doble transgènics INF β /IGF-II la combinació de la hiperexpressió de molècules MHC de classe I i classe II podria ser la responsable de l'elevada insulitis i de la ràpida progressió del procés diabètic observades en aquests ratolins.

D'altra banda, un dels *locus* associats amb la predisposició a desenvolupar diabetis en humans és el locus *IDDM2*, aquest locus conté el gen de la insulina i el de l'IGF-II. Tot i que els estudis que relacionen aquest *locus* amb alteracions en l'expressió d'IGF-II són controvertits, s'ha descrit que alteracions en els nivells d'expressió d'IGF-II també podrien relacionar-se amb la susceptibilitat a desenvolupar diabetis (Gennen, 1993; Polychronakos, 1995; Vafiadis, 1998b). Els ratolins transgènics que sobreexpressen IGF-II en cèl·lules β podrien representar un model que mimetitzaria la susceptibilitat a desenvolupar diabetis en individus amb variants al·lèliques del locus *IDDM2*. El nostre estudi també suggereix un paper clau de l'IGF-II en el locus *IDDM2*, i no només del gen de la insulina.

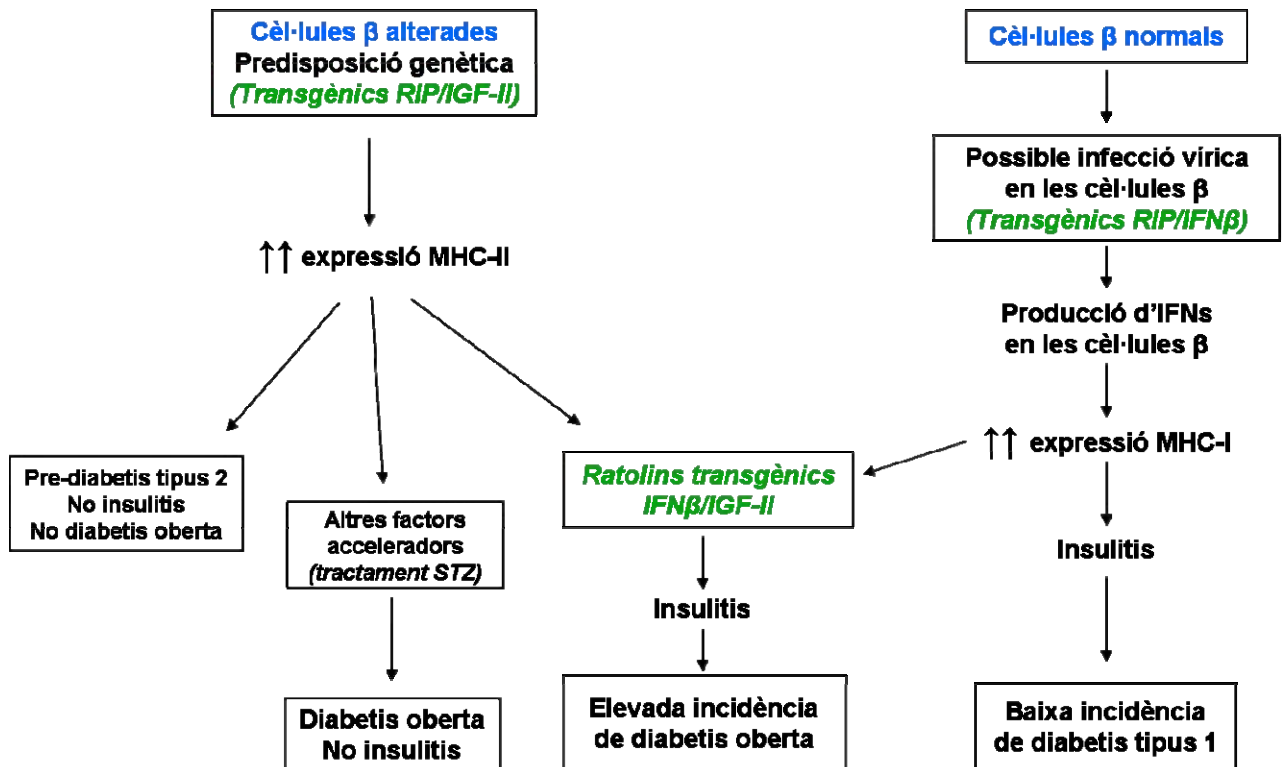
També, molt recentment, s'ha descrit que un dels locus associats al desenvolupament de diabetis tipus 2 es localitza en el gen *IGF2BP2* (Zeggini, 2007; Scott, 2007; Saxena, 2007). Aquest gen codifica per una proteïna citoplasmàtica d'unió a RNAm anomenada IMP2, que reprimeix la traducció del RNAm d'IGF-II (Nielsen, 1999). Tot i que encara es desconeix la funcionalitat d'aquest *SNP* en el gen d'*IGF2BP2*, donada la seva associació amb la susceptibilitat a desenvolupar diabetis tipus 2, fa pensar que aquest *SNP* podria alterar a IMP2 de manera que deixaria de bloquejar la traducció d'IGF-II, i per tant, molt probablement, incrementaria els nivells d'IGF-II en les cèl·lules β . Els resultats del nostre estudi demostren clarament que un augment d'IGF-II en cèl·lules β porta al desenvolupament de diabetis tipus 2.

Molts estudis suggereixen que la separació entre la diabetis tipus 1 i la diabetis tipus 2 no seria tant clara, sinó que la diferència entre ambdues seria, principalment, la rapidesa i els factors que desencadenen la mort de les cèl·lules β (Wilkin, 2001; Mathis, 2001). Els resultats obtinguts

amb els ratolins transgènics RIP/IGF-II estarien d'acord amb aquestes teories, ja que en aquests animals, la presència de certes alteracions a nivell de les cèl·lules β , pot donar lloc al desenvolupament d'un o altre tipus de diabetis en funció de quins factors ambientals intervenen en el procés.

Així doncs, en resum, els ratolins transgènics RIP/IGF-II presentarien una sèrie d'alteracions en les cèl·lules β , similars a les que es podrien trobar en alguns individus susceptibles a desenvolupar diabetis degut a certes alteracions genètiques (Unger, 1991; Brissova, 2002; Kulkarni & Kahn, 2004). Algunes d'aquestes alteracions en els ratolins transgènics RIP/IGF-II acaben donant lloc a la hiperexpressió de molècules MHC-II. Aquests animals, en una situació normal, acabarien desenvolupant un estat pre-diabètic tipus 2, i resistència a la insulina amb l'edat (Devedjian, 2000), sense desenvolupar diabetis oberta. En presència però d'un factor accelerador, com era el cas del tractament amb STZ, aquests animals desenvolupaven diabetis oberta. No obstant, quan a més a més de l'alteració funcional de les cèl·lules β , s'hi dona també una infiltració limfocitària, que podria venir donada per la infecció d'algun virus a nivell de cèl·lules β o per molt altres factors (en aquest cas la presència d'IFN β), la insulinitis present en els illots seria suficient com per trencar la tolerància i donar lloc al desenvolupament de diabetis oberta en un percentatge molt elevat dels individus (Von Herrath, 1995; Wen, 2000) (Esquema 2).

Així doncs, els ratolins RIP/IGF-II podrien ser un bon model per estudiar quines són les alteracions presents en les cèl·lules β que serien claus pel desenvolupament de diabetis. Aquest model seria útil també per a estudiar l'efecte que tindrien altres factors externs, com podrien ser les citoquines i àcids grassos circulants presents en situacions d'obesitat i estrès, entre altres, en la funcionalitat de les cèl·lules β i la seva contribució al desenvolupament de diabetis oberta. A més, el nostre estudi suggereix que l'increment d'IGF-II en cèl·lules β podria ser un possible factor implicat en el desenvolupament del procés diabètic.



Esquema 2. Esquema de la contribució de les alteracions gèniques i els factors externs en el desenvolupament de diabetis en els animals RIP/IGF-II. (adaptació de Pickup & Williams, 2003).

VI. CONCLUSIONS

- 1) Els ratolins transgènics RIP/IGF-II presenten intolerància a la glucosa, deguda probablement, a la disminució de la secreció d'insulina en resposta aquest sucre.
- 2) La menor secreció d'insulina en resposta a la sobrecàrrega de glucosa pot ser deguda a l'alteració dels nivells d'expressió d'algunes de les proteïnes implicades en el procés de captació del sucre, en especial el transportador Glut2.
- 3) Els illots dels ratolins RIP/IGF-II presenten un increment en l'expressió de gens involucrats en la matriu extracel·lular, molècules d'adhesió, inflamació i resposta immune; i una disminució en l'expressió de gens relacionats amb el metabolisme cel·lular.
- 4) Els illots dels ratolins RIP/IGF-II presenten una reducció dels nivells d'expressió de Pdx1 i HNF3 β (FOXA2). Aquesta podria estar relacionada amb la disminució dels nivells d'expressió de Glut2, d'insulina, així com d'altres factors de transcripció importants per la funcionalitat de les cèl·lules β , com HNF4 i MafA.
- 5) Les cèl·lules β dels ratolins RIP/IGF-II presenten una hiperexpressió de molècules de MHC de classe I i classe II. Aquesta expressió però, no dona lloc a l'aparició d'insulinitis, ni diabetis.
- 6) Les alteracions presents en les cèl·lules β dels ratolins RIP/IGF-II els fan més sensibles a desenvolupar diabetis oberta després del tractament amb estreptozotocina. Tant a dosis estàndards, com a dosis molt baixes, considerades no diabetogèniques pels ratolins control.
- 7) S'han obtingut ratolins doble transgènics que expressen IFN β i IGF-II en les cèl·lules β pancreàtiques (IFN β /IGF-II), mitjançant l'encreuament d'animals RIP/hIFN β amb ratolins RIP/IGF-II.
- 8) El 75% dels ratolins doble transgènics IFN β /IGF-II desenvolupen diabetis espontània durant els dos primers mesos de vida. Hem obtingut així un model de diabetis espontània.
- 9) Els ratolins transgènics RIP/IGF-II podrien ser un bon model per estudiar tant quines serien les alteracions presents en les cèl·lules β claus en la progressió de la diabetis, com també l'efecte que tindrien altres factors ambientals en la funcionalitat de les cèl·lules β i la seva contribució en el desenvolupament de diabetis oberta.
- 10) El nostre estudi suggereix que l'increment d'IGF-II en cèl·lules β podria ser un factor clau en l'inici del procés diabètic.

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 quimèric RIP/IGF-II en les cèl·lules β pancreàtiques s'havien generat a partir d'híbrids C57BL/6;SJL (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) (Devedjian, 2000), i els que expressen el gen del IFN β humà en cèl·lules β pancreàtiques s'havien generat també a partir d'híbrids C57BL/6;SJL (Pelegri, 1998) i posteriorment foren retrocreuats amb ratolins CD-1 fins arribar a la generació N15 (Casellas, 2006).

Tots els animals estaven alimentats *ad libitum*, és a dir, sense restringir-los l'accés al menjar, amb una dieta estàndard (2018S Teklad Global, Harlan Teklad, Madison, Wisconsin, EEUU) i es mantingueren en condicions de temperatura i llum controlades (cicles de 12 hores de llum i 12 hores de foscor). Quan va ser necessari, els animals es dejunaren durant 16 hores. Per l'eutanàsia, els animals s'anestesiaren mitjançant anestèsics inhaladors (Isoflurano, IsoFlo[®], Abbott Animal Health, Illinois, EEUU) i es decapitaren. Tots els procediments experimentals foren aprovats pel Comitè d'Ètica i d'Experimentació Animal i Humana de la Universitat Autònoma de Barcelona.

1.2. REACTIUS

Els reactius de biologia molecular s'obtingueren de les cases comercials Roche (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN, EEUU), Invitrogen Corporation (San Diego, CA, EEUU), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EEUU), Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EEUU), Sigma (St.Louis, MO, EEUU) i Promega Corporation (Madison, WI, EEUU). Els productes marcats radioactivament [α -³²P]dCTP s'adquiriren a Amersham Biosciences.

La estreptozotocina (ref. S-0130) es va adquirir de Sigma (St.Louis, MO, EEUU).

1.3. SONDES DE DNA

Les sondes utilitzades per detectar la incorporació del transgen mitjançant Southern blot foren les següents:

- sonda IGF-II : fragment de 220 pb del cDNA de l'IGF-II murí amplificat per PCR.
- sonda IFN β : fragment de 340 pb del cDNA de l'IFN β humà amplificat per PCR.

1.4. ANTICOSSOS

Els anticossos utilitzats per la realització de les immunohistoquímiques i Western blots van ser els següents:

- anticòs de conill porcí contra insulina porcina (I-8510) – Sigma Chemical Co., Saint Louis, Missouri, EEUU.
- anticòs de conill contra IGF2 (PAC1) – GroPep Ltd., Adelaide, Australia.
- anticòs d'ovella contra IFN β humà (AHC4024) - Biosource Internacional, Camarillo, EEUU.
- anticòs de conill contra glucagó (64701) – INC Biochemicals Inc., Aurora, OH, EEUU.
- anticòs de conill contra somatostatina (DJDS319) – LABGEN, LabClinics, Barcelona.
- anticòs de conill contra polipèptid pancreàtic humà (64771)– INC Biochemicals Inc., Aurora, OH, EEUU.
- anticòs de conill contra GLUT2 (AB1342) – Chemicon International Inc., CA, EEUU.
- anticòs de conill contra E-cadherina (sc-7870) – Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EEUU.
- anticòs d'ovella contra glucoquinasa - cedit pel Dr. Mark A. Magnuson, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, EEUU.
- anticòs de cabra contra beta-actina (ab8229) – Abcam, Cambridge Science Park, UK.
- anticòs secundari de cabra contra IgG de conill, biotinitat (31820) – PIERCE Biotechnology Inc., Rockford, IL, EEUU.
- anticòs secundari de conill contra IgG d'ovella, biotinitat (6150.08) – LabClinics, Barcelona.
- anticòs secundari de conill contra IgG de cabra, conjugat amb peroxidasa (PO449) – DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark.
- anticòs secundari de porc contra IgG de conill, conjugat amb peroxidasa (PO217) – DAKO
- anticòs secundari de conill contra IgG d'ovella, conjugat amb peroxidasa (PO163) – DAKO
- anticòs secundari de conill contra IgG de conill porcí, conjugat amb peroxidasa (PO141) – DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark.
- anticòs secundari de cabra contra IgG de conill, conjugat a Alexa Fluor 568 (TRITC) (A-11011)– Molecular Probes, Invitrogen, San Diego, CA, EEUU.
- anticòs secundari de cabra contra IgG de conill porcí, conjugat a Alexa Fluor 568 (TRITC) (A-11075) – Molecular Probes, Invitrogen, San Diego, CA, EEUU.
- anticòs secundari de conill contra IgG de conill porcí, conjugat a Alexa Fluor 488 (FITC) (A-11073) – Molecular Probes, Invitrogen, San Diego, CA, EEUU.
- streptavidina conjugada amb Alexa Fluor 488 (FITC) (S-11223) – Molecular Probes, Invitrogen, San Diego, CA, EEUU.

- streptavidina conjugada amb Alexa Fluor 568 (TRITC) (S-11226)– Molecular Probes, Invitrogen, San Diego, CA, EEUU.
- streptavidina conjugada amb Alexa Cy5 (PA45001) – Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EEUU.
- Hoechst (B2261) - Sigma Chemical Co., Saint Louis, Missouri, EEUU.
- TUNEL – Kit Roche (1.684817) - F.Hoffmann, Roche Diagnostics Corp., IN, EEUU.

2. MÈTODES

2.1. DETECCIÓ DELS ANIMALS TRANSGÈNICS

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

2.1.1. Obtenció de DNA genòmic

Per l'obtenció de DNA genòmic es seguia una adaptació del mètode de De Wet (De Wet et al., 1987). Fragments de cua, d'uns 0,5 cm, d'animals de tres setmanes d'edat es digerien en una solució tamponada que contenia proteinasa K i SDS i s'incubava a 56°C tota la nit. Aquesta incubació permet la digestió del teixit per la proteinasa K, alliberant-se el DNA genòmic de les cèl·lules. Posteriorment es purificava el DNA. S'afegien 250µl d'una solució saturada de NaCl, es centrifugava durant 15 minuts a 12000xg i es recuperava el sobrenadant. A partir d'aquest sobrenadant es precipitava el DNA genòmic mitjançant l'addició de 500µl d'isopropanol i es centrifugava de nou 15 minuts a 12000xg. Es descartava el sobrenadant mitjançant aspiració i posteriorment es rentava el *pellet* de DNA amb etanol 70%. Es tornava a centrifugar durant 10 min a 12000xg i es descartava de nou el sobrenadant per aspiració. Finalment el DNA es resuspensia en 65µl d'aigua miliQ, prèviament escalfada a 65°C per afavorir la resuspensió. El DNA obtingut s'analitzava posteriorment mitjançant Southern blot

Solució de llisi

Tris-HCl pH 8.5	100 mM
EDTA pH 8	5 mM
SDS	0.2 % (p/vol)
NaCl	200 mM
Proteinasa K	1 mg/mL

2.1.2. Anàlisi del DNA per Southern blot

2.1.2.1. Digestió i electroforèsi del DNA genòmic

Es digerien 10 µg del DNA genòmic durant tota la nit a 37°C amb l'enzim de restricció adequat segons el transgen que es volgués analitzar (Bam HI en el cas d'IGF-II i Bgl II en el cas d'IFNβ). El dia següent, s'afegia tampó de càrrega 10x (Glicerol 50%, EDTA 100mM, SDS 1% i blau de bromofenol 0,1%) al DNA genòmic digerit i es realitzava una electroforèsi en gels de l'1% d'agarosa/TAE 1x. En l'electroforèsi de DNA s'utilitzà com a marcador de pes molecular el *DNA Molecular Weight Marker X* (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN). Es deixaven córrer les digestions durant 4-5 hores entre 50-60 volts. Posteriorment es realitzava el tractament del gel per tal de permetre la transferència del DNA a la membrana de nylon, aquest tractament consisteix en: 15 minuts en una solució HCl 0.25M, per aconseguir la despurinització i assegurar la transferència filtre dels fragments d'elevat pes molecular; 20 minuts en un solució alcalina (1.5M NaCl, 0.5M NaOH) per tal de desnaturalitzar el DNA i facilitar-ne també la transferència; i un mínim de 20 minuts en una solució neutralitzant (1M Tris, 3M NaCl) que permetrà neutralitzar el pH i carregar negativament el DNA de nou.

TAE 1x

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

2.1.2.2. Transferència del DNA a la membrana

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

20xSSC

NaCl	3 M
Citrat sòdic	0.3 M, pH 7,4

2.1.2.3. Marcatge radioactiu de les sondes de DNA

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

2.1.2.4. Hibridació de la membrana

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

Solució de prehibridació i hibridació

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

2.1.2.5. Rentats de la membrana i revelat

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

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

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

2.1.3. Anàlisi del DNA per PCR

L'anàlisi del DNA per PCR és un mètode que permet detectar els animals transgènics molt més ràpidament si es disposa dels primers adequats. La PCR s'utilitzava per la detecció dels animals transgènics RIP/IGF-II i RIP/IFN β .

En la PCR d'IGF-II, els primers amplificaven una banda d'uns 440pb procedent del gen endogen en els ratolins control; i en cas dels ratolins transgènics s'amplificava la banda de 440pb de l'endogen i una banda d'uns 200pb procedent del cDNA del gen quimèric. D'aquesta manera en el cas dels ratolins control obteníem una sola banda, i en el cas dels ratolins transgènics n'obteníem dues, una que provenia del gen endogen i l'altre del transgen. La seqüència dels primers i la seva localització és la següent:

IGF-II fwd: 5' - CCT CTC AGG CCG TAC TTC CG - 3' (1093nt →)

IGF-II rev: 5' – GGT GGT AAC ACG ATC AGG GG - 3' (← 1423nt)

Les condicions eren les següents :

Mix 1 - 8 μ l Buffer (5x)
2,4 μ l Mg²⁺ (25mM)
200-300ng DNA mostra
H₂O miliQ fins a volum total 40 μ l

Mix 2 - 2 μ l (5x)
0,6 μ l Mg²⁺ (25mM)
0,4 μ l dNTP mix (25 mM each)
1 μ l oligos mix (10 mM each)
0,1 μ l Taq pol. (5 U/ μ l)
H₂O miliQ fins a volum total 10 μ l

El cicle era el següent:

Afegir mix 1
Hot start - 5 min 95°C
Afegir mix 2
2 min a 95°C
38 cicles 40" a 95°C
30" a 64°C
30" a 72°C
15 min a 72°C
manteniment a 4°C

En la PCR d'IFN β , els primers amplificaven un fragment de 340 pb del cDNA d'IFN β humà. D'aquesta manera només obteníem banda en el cas de les mostres de DNA de ratolins transgènics. Els primers utilitzats són els següents:

RIP: 5' – AAG TGT TTG GAA ATT ACG GC - 3'

IFN β : 5' – TGG AGA AGC ACA ACA GGA GA - 3'

Les condicions eren les següents :

Mix - 6 µl Buffer (5x)
2,4 µl Mg²⁺ (25mM)
0,4 µl dNTPs mix (25 mM each)
0,3 µl oligos mix (10 mM each)
0,2 µl Taq pol. (5 U/µl)
150-200ng DNA
H₂O fins a volum total 30 µl

El cicle era el següent:

2 min a 95°C
40 cicles 30" a 94°C
20" a 58°C
30" a 72°C
1 min a 72°C
manteniment a 4°C

2.2. EXTRACCIÓ D'ILLOTS PANCREÀTICS

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

Hank's (Quantitats per preparar 1 L)

NaCl	8 g
KCl	400 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	155 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	200 mg
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	127 mg
KH ₂ PO ₄	60 mg
Gassejar durant 10 min amb carbogen (95% O ₂ , 5% CO ₂)	
Afegir NaHCO ₃	380 mg
Ajustar el pH a 7,4	

Nota: La solució de Hank's es preparava dies abans i es guardava filtrada (0,22µm) a 4°C.

El mateix dia en que es realitzava l'obtenció dels illots s'hi afegia 1mg/ml de BSA i 3mM de glucosa. A partir d'aquesta solució de Hank's-BSA amb glucosa es preparava la solució de col·lagenasa i les posteriors solucions de rentat i pesca dels illots.

2.3. EXTRACCIÓ DE RNA

2.3.1. Extracció de RNA d'illots pancreàtics

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

2.3.2. Extracció de RNA de pàncrees total

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

2.4. PCR A TEMPS REAL

Per tal de quantificar els nivells d'expressió gènica en illots pancreàtics o pàncrees total, s'utilitzà la tècnica de PCR a temps real, també anomenada PCR quantitativa (*Q-PCR*). La determinació dels nivells d'expressió gènica requereix de dos passos: un primer pas per obtenir cDNA a partir de les mostres de RNA, obtingudes prèviament tal i com s'ha descrit anteriorment; i un segon pas consistent en la PCR a temps real a partir d'aquest cDNA. En un volum final de 20µL, i a partir d'1µg de RNA total, s'obtingué el cDNA mitjançant el producte comercial *Omniscript RT[®] kit* (QIAGEN Sciences, Maryland, USA). En aquesta reacció de retro-transcripció s'utilitzaren *oligo-dT* com a primers de la reacció i el producte comercial *Protector RNase Inhibitor* com a inhibidor de RNases, ambdós productes de Roche (Roche Diagnostics). Un cop obtinguts els cDNAs de les diferents mostres de RNA es determinà l'expressió gènica

mitjançant PCR a temps real, utilitzant el sistema *SmartCycler II*[®] (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) i el producte comercial *QuantiTect*[®] *SYBR*[®] *Green PCR* (QIAGEN Sciences, Maryland, USA). Cada reacció de 25 µl contenia: 2µL d'una dilució 1:2 del cDNA, 12.5µL de la *QuantiTect*[®] *SYBR*[®] *Green PCR Master mix* (MgCl₂ 2.5 mM) i el parell de primers *forward* i *reverse* específics per a cada gen determinat, a una concentració final de 0.4µM. Les seqüències dels primers utilitzats foren les següents:

GEN	Primer 5' (forward)	Primer 3' (reverse)	Temp. °C
β2-microglobulina	CCGGAGAATGGGAAGC	GTAGACGGTCTTGGGC	55 °
Beta2/NeuroD1	ACTCCAAGACCCAGAACTGTC	ACTGGTAGGAGTAGGGATGCAC	55 °
CIITApIV	GAGCTGGCGGGAGGGAG	GAAGTGGTCGCAGTTGATG	57°
Glucoquinasa	TGAGCCGGATGCAGAAGG	GCAACATCTTTACTGGCCT	60 °
Glut1	CAGTTCGGCTATAACTGTTG	GCCCCGACAGAGAAGATG	60 °
Glut2	CTGGAGCCCTCTTGATGGGA	CCAGTCTGAAATTAGCCAC	61.9 °
HNF-1a	ATGAGCCGTGCTCTCCAG	GTT GGA TGG CAG CAG GTG	59 °
HNF-3b	GGCTCCTTCTGGACCCTG	ACC TCG CTT GTG CTC CTG	55 °
HNF-4a	TGCCAACCTCAATTCATCCA	GCTCGAGGCTCCGTAGTGT	59 °
Insulina	TCTTCTACACCCCATGTCCC	GGTGCAGCACTGATCTAC	60 °
Kir6.2	GCAGAAACCCTCATCTTCAGC	CAGAGTGGTGTGGCACTTTA	60 °
Nlx6.1	CCCGGAGTGATGCAGAGT	GAACGTGGGTCTGGTGTGT	60 °
MafA	AGGAGGAGGTCATCCGACTG	CTTCTCGCTCTCCAGAATGTG	60 °
MHC class II	CTCTGATTCTGGGGTCTCT	ACCATAGGTGCCTACGTGGT	60 °
Pdx1	CGGACATCTCCCCATACG	AAAGGGAGCTGGACGCGG	55 °
RBS	ATTCGCTGCACGAAGTGGC	CAGCAGGTCTGAATCGTGGT	60 °
SUR1	GCATCAACTTGTCTGGTG	ACTGTCTCTTGTATCC	61.9 °

Les condicions de temps i temperatura utilitzades en les PCRs van ser: un primer cicle de 15 minuts a 95°C, seguit de 45 cicles d'amplificació (fase de desnaturalització: 15 segons a 95°C; fase d'aparellament dels oligonucleòtids: 30 segons a la temperatura fixada per cada parella de primers i que es mostra en la taula anterior; fase d'extensió: 30 segons a 72 °C). Cada reacció es realitzà per triplicat a partir de les mostres de cDNA de ratolins control i transgènics de diferents experiments. La tecnologia *SmartCycler II*[®] ens proporcionà, per a cada gen analitzat, el càlcul de la C_t de cada mostra per cada triplicat. La C_t correspon al número de cicle en que es produeix l'increment significatiu de fluorescència en la reacció, el qual és proporcional al número de molècules de cDNA que hi havia en un principi. A partir de les C_t, es calculava el nivell d'expressió gènica dels diferents gens analitzats en ambdós grups d'animals mitjançant la fórmula matemàtica descrita per Pfaffl (Pfaffl, 2001). Per poder determinar les diferències en l'expressió gènica dels grups experimentals, es va normalitzar el nivell d'expressió dels diferents gens analitzats per la quantitat de cDNA total present en cada mostra.

Per tal de determinar aquesta quantitat de cDNA total es van determinar els nivells d'expressió d'un gen *housekeeping*, l'expressió del qual no estigués alterada en els diferents grups experimentals. En els nostres càlculs utilitzarem com a *housekeeping* el gen RBS. Els resultats s'expressen com la relació entre el nivell d'expressió del gen en cada grup experimental respecte a les expressions en els animals control, estandarditzats per l'expressió del gen RBS en cada un d'ells (ratio= $2^{-\Delta Ct_{\text{gen}} (\text{Con-Tg})} / 2^{-\Delta Ct_{\text{RBS}} (\text{Con-Tg})}$). D'aquesta manera, les dades es representen com a l'expressió de mRNA de cada gen en cada grup experimental relativa al nivell d'expressió en els animals control.

2.5. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ DE GENS MITJANÇANT MICROARRAYS DE DNA

Els experiments de *microarrays* es van realitzar en col·laboració amb la plataforma de *microarrays* del Projecte β -cell Therapy (Microarray Facility, Dpt of Clinical Biochemistry, Rigshospitalet, Blegdamsvej, Dinamarca).

S'obtingueren illots pancreàtics de ratolins 9 ratolins control i 9 ratolins transgènics RIP/IGF-II, a partir del procediment descrit en el punt 2.2. Aquests 18 animals s'agruparen en 6 grups de 3 animals cada un, s'obtingueren els illots dels animals de cada grup en conjunt, com a pool; s'obtingueren per tant 6 pools d'illots pancreàtics: 3 pools d'illots control i 3 pools d'illots transgènics RIP/IGF-II, i cada un dels pools estava format pels illots pancreàtics provinents de 3 animals. Es va realitzar l'extracció de RNA d'aquests 6 pools seguint el protocol descrit en l'apartat 2.3.1. Es quantificà el RNA mitjançant espectrofotometria i s'enviaren 2 μ g d'aquests RNAs al laboratori de la plataforma de *microarrays* del Projecte β -cell Therapy (Microarray Facility, Dpt of Clinical Biochemistry, Rigshospitalet, Blegdamsvej, Dinamarca). Allà es realitzà la comprovació de la qualitat de les mostres, es va retrotranscriure el RNA a cDNA i es feren els experiments de *microarrays* utilitzant els xips MOE430 2.0 d'Affimetrix. L'anàlisi informàtic de les dades generades a partir d'aquest experiment de *microarrays* es realitzaren en el Servei de Genòmica Funcional de PROGENIKA (PROGENIKA BIOPHARM, S.A., Derio, Vizcaya).

2.6. EXTRACCIÓ I ANÀLISI DE PROTEÏNES

2.6.1. Extracció de proteïnes d'illots pancreàtics

L'extracció de proteïnes d'illots pancreàtics es feia a partir del *pellet* d'illots que obteníem rentant-los amb PBS 1x després d'haver-los pescat. Aquest *pellet* es resuspensia amb uns 80 μ l del tampó d'homogeneització de proteïnes. Immediatament abans d'utilitzar el tampó d'homogeneització s'hi afegien els inhibidors de proteases (una pastilla d'inhibidors per cada 10mL de tampó – Complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets de Roche Diagnostics GMBH, Germany). Un cop resuspès el *pellet* d'illots es deixava 30 minuts en gel i

finalment s'homogeneïtzava mitjançant un ultrasonicador. Es centrifugava a 1000xg durant 2 minuts a 4°C. A partir d'aquest sobrenadant es determinava la concentració de proteïnes de l'extracte mitjançant el mètode Bradford. La resta d'extracte de proteïnes es guardava a -20°C fins a la seva propera utilització.

Tampó d'homogeneïtzació de proteïnes

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

2.6.2. Extracció de proteïnes de pàncrees total

Les proteïnes de pàncrees total es van obtenir mitjançant l'homogeneïtzació dels fragments de teixit congelat, uns 100mg de teixit per cada 1mL de tampó d'homogeneïtzació, utilitzant un homogeneïtzador de tipus Polytron®. Igual que pel cas de l'extracció de proteïnes d'illots pancreàtics, immediatament abans d'utilitzar el tampó d'homogeneïtzació s'hi afegien els inhibidors de proteases (una pastilla d'inhibidors per cada 10mL de tampó; Complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets de Roche Diagnostics GMBH, Germany). Després d'homogeneïtzar el teixit, l'extracte es va mantenir en agitació a 4°C durant 1-2 hores i posteriorment es va centrifugar a 16000xg durant 20 minuts a 4°C. A partir del sobrenadant, es va determinar la concentració de proteïnes de l'extracte mitjançant el mètode Bradford. La resta de l'extracte es va guardar congelat (-20°C) fins a la seva propera utilització.

2.6.3. Determinació de la concentració de proteïnes

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

dels extractes de pàncrees total es realitzaren dilucions 1:50 de les mostres; en el cas dels extractes d'illots pancreàtics no fou necessari realitzar dilucions. Després d'afegir el reactiu de Bradford les mostres es sacsejaren i s'incubaren durant 5-10 minuts a temperatura ambient. Posteriorment es determinà l'absorbància de les mostres a una longitud d'ona de 595nm. La concentració de proteïna dels diferents extractes s'obtingué a partir de la interpolació de les seves absorbàncies a la recta patró calculada.

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

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

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

2.6.4.2. Transferència de proteïnes a membranes i immunodetecció

L'electrotransferència de les proteïnes des del gel a les membranes de PVDF (Hyperbond-P, Amersham Biosciences) es realitzà amb l'aparell Transblot model 2051 de LKB/Pharmacia, a 100V durant dues hores a 4°C en un tampó d'electrotransferència (Tris 25 mM, Glicina 150 mM, Metanol 20%). Després de la transferència les membranes es tenyien amb Ponceau per tal de comprovar la qualitat de les proteïnes i la homogeneïtat en la càrrega dels diferents pous. Posteriorment les membranes es rentaven per eliminar el Ponceau i es bloquejaven. El bloqueig es realitzava amb TBS-T (Tris-HCl 25 mM, NaCl 137 mM, Tween20 0.05%) amb un 5% de llet desnatada en pols, o bé TBS-T amb un 5% d'albumina sèrica bovina (BSA), depenent del protocol de l'anticòs a utilitzar. El bloqueig es realitzava durant 2 hores en agitació a

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

2.7. DETERMINACIÓ DE PARÀMETRES SÈRICS

El sèrum s'obtenia o bé a partir de mostres de sang de 15-20 µl obtingudes per la cua; o bé a partir de la decapitació dels ratolins en els estudis de punt final. En tots dos casos la sang es recollia en tubs no heparinitzats i es deixava coagular durant 30 min a 4°C, posteriorment es centrifugava a 6000xg durant 20 minuts per a l'obtenció del sèrum, aquest es mantenia congelat (-20°C) fins al moment de la determinació dels diferents paràmetres.

2.7.1. Glucosa

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

2.7.2. Insulina

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

2.7.3. IFN-β

Els nivells d'IFN-β humà en sèrum es determinaren per ELISA a partir dels sèrums obtinguts en els estudis de punt final. El kit que s'utilitzà fou el *Enzyme-Linked-Sorbent Assay, Human Interferon-β (HuIFN-β) ELISA Kit* distribuït per TFB, i fabricat per Fujirebio INC., Tokyo, Japó.

2.8. TEST DE TOLERÀNCIA A LA GLUCOSA

El test de tolerància a la glucosa s'utilitza per comprovar si els ratolins són capaços de respondre correctament a una sobrecàrrega de glucosa, valorant així el nivell de tolerància al sucre. Aquells animals que mantenen les glucèmies elevades i no recuperen els nivells bassals de glucosa durant el temps de realització del test són considerats animals intolerants a la glucosa. Els animals escollits per a la realització del test es dejunaven durant 16 hores, passades les hores de dejuni es pesaven i es determinava la glucèmia basal a partir d'una gota de la vena de la cua mitjançant el sistema Glucometer Elite[®]. Posteriorment se'ls injectava intraperitonealment una dosi de 2 g de glucosa/Kg de pes viu. A partir d'aquest moment es realitzaren extraccions de sang seriades amb un interval de 30 minuts de temps fins a les 3 hores de l'inici del test per tal de determinar l'evolució de la glucèmia al llarg del temps. Durant aquest procés els animals no tenien accés ni al menjar ni a l'aigua. Els resultats s'expressen com les glucèmies en mg/dL en els diferents punts de l'experiment.

2.9. SECRECIÓ D'INSULINA *IN VIVO*

Quan interessa quantificar i valorar la secreció d'insulina *in vivo* dels diferents animals en resposta a la sobrecàrrega de glucosa, es realitza mitjançant un procediment molt similar al test de tolerància a la glucosa, descrit en el punt 2.9. Els animals escollits per a la realització del test es dejunaven durant 16 hores, passades les hores de dejuni es pesaven, es determinava la glucèmia basal mitjançant el sistema Glucometer Elite[®] i s'obtenien uns 50 µl de sang a partir de la vena de la cua, en tubs no heparinitzats. Posteriorment se'ls injectava intraperitonealment una dosi de 3 g de glucosa/Kg de pes viu. A partir d'aquest moment es realitzaren extraccions de sang, del mateix volum que en el cas inicial, als 2, 5, 15 i 30 minuts de la injecció de la glucosa. Durant aquest procés els animals no tenien accés ni al menjar ni a l'aigua. Un cop finalitzat el test la sang es deixava coagular i posteriorment es centrifugava a 6000xg, 20' a 4°C i se n'obtenia el sèrum. A partir d'aquest sèrums es determinava la concentració d'insulina tal i com es descriu en el punt 2.7.2. Els resultats s'expressaven com les insulinèmies ng/ml en els diferents punts de l'experiment.

En alguns casos l'estudi de secreció d'insulina *in vivo*, es realitzà en paral·lel amb procediment descrit en el punt 2.9. S'aprofitava la injecció de 2g/kg de glucosa per mirar l'evolució de la glucèmia cada 30 minuts i a la vegada s'obtenia un volum de sang en cada punt, suficient (50µl) com per mesurar també la concentració d'insulina en sang al llarg de tot l'experiment. Un cop acabat el test el procediment era el mateix que en el cas de la injecció de

3g/kg de glucosa. Les sang es centrifugaven per tal d'obtenir-ne el sèrum i fer la posterior determinació de la concentració d'insulina.

2.10. INDUCCIÓ DE LA DIABETIS EXPERIMENTAL MITJANÇANT STZ

L'estreptozotocina (STZ) és un antibiòtic d'ampli espectre derivat de *Streptomyces acrhomogenes* d'estructura constituïda per una molècula de N-metil-N-nitrosurea unida al C-2 de la D-glucosa. És un tòxic que actua majoritàriament sobre la cèl·lula β pancreàtica, a la qual destrueix. El mecanisme de toxicitat sobre aquestes cèl·lules es dona a través del reconeixament del transportador de glucosa GLUT2, la part d'estructura similar a la glucosa que té aquesta droga permet l'entrada a les cèl·lules que tenen aquest sistema de transport.

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

2.11. ANÀLISI IMMUNOHISTQUÍMICA DEL PÀNCREES

Els pàncrees dels ratolins es fixaren amb una solució tamponada de formol al 10% durant 24 hores a 4°C i a continuació s'incloïen en parafina (includor tipus Histokinette) i se n'obtenien seccions (2-3 μ m) amb l'ajut d'un microtom, les quals posteriorment es desparafinaven i es processaven. Les seccions s'incubaren durant tota la nit a 4°C amb els anticossos corresponents: contra insulina (1/100), contra IGF-II (1/20), contra IFN β (1/500), contra glucagó (1/100) i contra GLUT2 (1/400). Posteriorment s'incubaren amb els corresponents anticossos secundaris (1/300) i streptavidina conjudada amb fluoròfors en el cas de les immunohistoquímiques en fluorescència (1/300). Com a cromogen s'utilitzà la diaminobenzidina (DAB). Tots els anticossos utilitzats són els descrits anteriorment en la part de Materials.

2.11.1. Determinació de la massa de cèl·lula β

L'àrea de cèl·lules β del pàncrees es delimitava mitjançant la immunodetecció de la insulina, contrarrestada amb Mayer's hematoxilina. El percentatge de cèl·lula β es va calcular dividint el sumatori de les àrees que presentaven positivitat per la insulina en una secció de pàncrees per l'àrea total de la secció i multiplicant aquesta relació per 100. La massa de cèl·lula β es va calcular multiplicant el pes del pàncrees pel percentatge de l'àrea de cèl·lula β obtingut. Per aquestes anàlisis morfològiques les immunohistoquímiques d'insulina es realitzaren en 3 porta-objectes amb 2 seccions seriades (3 μ m) cadascun, separats cada un dels portaobjectes

per unes 100 µm (diàmetre mig aproximat d'un illot de ratolí), d'aquesta manera s'evitaven les variacions degudes a les diferents zones del pàncrees.

Per la mesura de les àrees s'utilitzà un microscopi Nikon Eclipse E800 (Nikon Corp., Tokio, Japó) connectat a una camera digital SONYTM eCCD. Les mesures es van dur a terme amb un analitzador d'imatges (analySIS3.0, SoftImaging System Corp., Lakewood, Co). L'àrea de la secció es determinà a x10 augments i l'àrea dels illots a x100 augments. El sistema es va calibrar per obtenir els resultats en mil·límetres i micròmetres, respectivament.

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

La mesura de l'apoptosis es va realitzar mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica de TUNEL. Per tal de realitzar aquesta immunohistoquímica les mostres es desparafinaren i seguidament es tractaren amb Proteinasa K (10 µg/ml) amb Tris/HCl, pH 7.6, uns 10 min a 37°C i es permeabilitzaren amb Triton X-100 (0.1%) amb PBS 1x durant 2 min. Finalment, es realitzà 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 (1/100), de conill contra somatostatina (1/750) i de conill contra polipèptid pancreàtic (1/2000). Com a anticòs secundari pel coctail s'utilitzà un anticòs de cabra contra conill marcat amb biotina (1/300) i streptavidina marcada amb Alexa 568 (1/300). A més es contrastaren les mostres amb Hoechst (1/100) per descartar falsos positius i assegurar que eren nuclis i no eritròcits.

2.11.3. Detecció de replicació en la cèl·lula β

La mesura de la replicació en les cèl·lules β es va realitzar mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica de Ki67. Aquesta proteïna s'ha descrit que s'expressa a nivells baixos durant la fase final de G1 i que s'acumula durant les fases S, G2 i M (Starborg, 1996), per tant s'utilitza en molts casos com indicador de replicació. Mostra les cèl·lules amb cert potencial per replicar, però no exactament les que en aquell moment s'estan dividint. Per tal de realitzar aquesta immunohistoquímica les mostres es desparafinaren i seguidament es tractaren amb Proteinasa K (10 µg/ml) amb Tris/HCl, pH 7.6, uns 10 min a 37°C i es permeabilitzaren amb Triton X (0.1%) amb PBS durant 2 min. Finalment, es va realitza una doble tinció amb anticossos de conill contra insulina (1:100), i contra Ki67 per detectar replicació en les cèl·lules β . Com a anticòs secundari per la insulina s'utilitzà un anticòs de cabra contra conill marcat amb biotina (1:200) i streptavidina marcat amb TEXAS RED (1:100). A més es contrastaren les mostres amb Hoechst (33258) per descartar falsos positius i assegurar que eren nuclis i no eritròcits.

2.11.4. Anàlisi del percentatge d'infiltració.

Per determinar el grau d'infiltració dels illots les seccions del pàncrees s'incubaren amb un anticòs anti-insulina (1:100) i es contrastaren amb hematoxilina. Per aquestes anàlisis morfològiques les immunohistoquímiques d'insulina es realitzaren en 3 seccions separades 100 µm (diàmetre mig aproximat d'un illot de ratolí), d'aquesta manera s'eviten les variacions degudes a les diferents zones del pàncrees. Es contaren el número d'illots totals a cada secció i el número d'illots infiltrats. Les dades s'expressen com el percentatge del grau d'infiltració pel total d'illots.

2.12. ANÀLISIS ESTADÍSTIQUES.

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

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Abbas A.K., Lichtman A.H. and Pober J.S. (1995) *Cellular and molecular immunology, Second edition*. McGraw Hill.
- Ackermann A.M. and Gannon M. (2007) Molecular regulation of β -cell mass development, maintenance, and expansion. *Journal of molecular endocrinology*, **38**: 193-206.
- Adorini L., Gregori S. and Harrison L.C. (2002) Understanding autoimmune diabetes: Insights from mouse models. *Trends Mol.Med.*, **8**: 31-38.
- Åkerblom H.K., Knip M. (1998) Putative environmental factors in type 1 diabetes. *Diabetes Metab.Rev.*, **14**: 31-67.
- Alba A., Puertas C., Carrillo J. et al. (2004) IFN β accelerates autoimmune type 1 diabetes in NOD mice and breaks the tolerance to β cells in nondiabetes-prone mice. *The Journal of Immunology*, **173(11)**: 6667-75.
- 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., Malcolm L., Chosich N. 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., Morahan G. and Miller J.F. (1992) Inflammation but not auto-immunity occurs in transgenic mice expressing constitutive levels of interleukin-2 in islet β cells. *Eur.J.Immunol.*, **22**: 1115-1121.
- Allison, J., McClive P., Oxbrow L., et al. (1994) Genetic requirements for acceleration of diabetes in non-obese diabetic mice expressing IL-2 in islet β -cells. *Eur.J.Immunol.*, **24**: 2535-2541.
- Andreoletti L., Hober D., Hober-Vandenbergh C., Belaich S., Vantghem M.C., Lefebvre J. and Wattré P. (1997) Detection of coxsackie B virus RNA sequences in whole blood samples from adult patient at the onset of Type 1 diabetes mellitus. *J.Med.Virol*, **52**: 121-127.
- Araki E., Lipes M.A., Patti M.E., Bruning J.C., Haag B., Johnson R.S. and Kahn C.R. (1994) Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*, **372**: 186-190.
- 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.
- Baisch J.M., Weeks T., Giles R. et al. (1990) Analysis of HLA-DQ genotypes and susceptibility in insulin-dependent diabetes mellitus. *N.Engl.J.Med.*, **322**: 1836-1841.
- Banerjee S. and Smallwood A. (1995) A chromatin model of IGF2/H19 imprinting. *Nat.Genet.*, **11**: 237-238.
- Bedoya F.J., Solano F. and Lucas M. (1996) N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islet. *Experientia*, **52**: 344-347.
- Bell G.I., Selby M.I., Rutter W.J. (1982) The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences. *Nature*, **295**: 31-35.
- Bell G.I., Horita S., Karam J.H. (1984) A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*, **33**:176-183.
- Bell G.I., Gerhard D.S. et al. (1985) Isolation of the human insulin-like growth factor genes: insulin-like growth factor II and insulin genes are contiguous. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**: 6450-6454.
- Bell G.I. and Polonsky K.S. (2001) Diabetes Mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature*, **414**: 788-791.

- Ben-Shushan E., Marshak S., Shoshkes M., Cerasi E., Melloul D. (2001) A pancreatic beta-cell-specific enhancer in the human PDX-1 gene is regulated by hepatocyte nuclear factor 3beta (HNF-3beta), HNF-1alpha, and SPs transcription factors. *J.Biol.Chem.*, **276** (20): 17533-17540.
- Bendelac A., Carnaud C., Boitard C., Bach J.F. (1987) Syngenic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J.Exp.Med.*, **166**: 823-832.
- Bennett S.T., Lucassen A.M., Gough S.C.L., Powell E.E., Undlien D.E., Pritchard L.E., Todd J.A. *et al.* (1995) Susceptibility to human type I diabetes at *IDDM2* is determined by tandem repeat variation at the insulin minisatellite locus. *Nat.Genet.*, **9**: 284-292.
- Bennett S.T. *et al.* (1996) *IDDM2-VNTR*-encoded susceptibility to type 1 diabetes; dominant protection and parental transmission of alleles of the insulin gene-linked minisatellite locus. *J.Autoimmun.*, **9**: 415-421.
- Böhme J., Haskins K., Stecha P., Van Ewijk W., Lemeur M., Gerlinger P., Benoist C., Mathis D. (1989) Transgenic mice with I-A on islet cells are normoglycemic but immunologically intolerant. *Science*, **244**: 1179-1183.
- Bottazzo G.F., Florin-Christiensen A. and Doniach D. (1974) Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*, **2**: 1279-1283.
- Bottazzo G.F., Dean B.M., McNally J.M., MacKay E.H., Swift P.G.F. and Gamble D.R. (1985) *In situ* characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis. *N.Engl.J.Med.*, **313**: 353-360.
- Boucher M.-J., Selander L., Carlsson L. and Eldlund H. (2006) Phosphorylation marks IPF1/ PDX1 protein for degradation by Glycogen synthase kinase-3-dependent mechanisms. *J.Biol. Chem.*, **281**: 6395-6403.
- Bouwens L., Rooman I. (2005) Regulation of Pancreatic Beta-Cell Mass. *Physiol Rev*, **85**: 1255–1270.
- Brissova M., Wright C.V.E., Powers A.C., *et al.* (2002) Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *J.Biol.Chem.*, **277**: 11225-11232.
- Brissova M., Blaha M., Spear C., Wright C.V.E., Powers A.C., *et al.* (2005) Reduced PDX-1 expression impairs islet response to insulin resistance and worsens glucose homeostasis. *Am.J. Physiol.Endocrinol.Metab.*, **288**: E707-E714.
- Brissova M., Shostak A., Shiota M., Gannon M., Powers A.C. *et al.* (2006) Pancreatic islet production of vascular endothelial growth factor-a is essential for islet vascularization, revascularization, and function. *Diabetes*, **55**: 2974-2985.
- Bruce D.G., Chisholm D.J., Storlien L.H. and Kraegen E.W. (1988) Physiological importance of deficiency in early prandial insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes*, **37**: 736-744.
- Budd G.C., Pansky B., Glatzer L. (1993) Preproinsulin mRNA in the rat eye. *Invest. Ophthalmol.Vis.Sci.*, **32**(2): 463-469.
- Butler A.E., Janson J., Bonner-Weir S., Ritzel R., Rizza R.A., Butler P.C. (2003) Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, **52**: 102-110.
- Campbell I.L., Bizilj K., Colman P.G., Tuch B.E., Harrison L.C. (1986) Interferon-gamma induces the expression of HLA-A, B, C but not HLA-DR on human pancreatic beta-cells. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, **62**: 1101-1109.
- Campbell I.L., Hobbs M.V., Dockter J., Oldstone M.B.A. and Allison J. (1994) Islet inflammation and hyperplasia induced by the pancreatic islet-specific overexpression of interleukin-6 in transgenic mice. *Am.J. Pathol.*, **145**: 157-166.
- Casellas, A., Salavert A., Agudo J., Ayuso E., Jimenez V., Moya M., Muñoz S., Franckhauser S. and Bosch F. (2006) Expression of IGF-I in pancreatic islets prevents lymphocytic infiltration and protects mice from type 1 diabetes. *Diabetes*, **55**: 3246-3255.

- Cerf M.E., Muller C.J.F., Du Toit D.F., Louw J., Wolfe-Coote S.A. (2005) Transcription factors, pancreatic development, and β -cell maintenance. *Biochem and Biophys Res Comm*, **326**: 699-702.
- Chankiewitz E., Peschke D., Herberg L., Bazwinsky I., Mühlbauer E., Brömme H-J. and Peschke E. (2006) Did the gradual loss of GLUT2 cause a shift to diabetic disorders in the New Zealand Obese mouse (NZO/HI)? *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes*, **114**: 262-269.
- Cheatham B. and Kahn C.R. (1995) Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr. Rev*, **16**:117-142.
- Chen L., Thorens B.B., Bonner-Weir S., Weir G.C., Leahy J.L. (1992) Recovery of glucose-induced insulin secretion in a rat model of NIDDM is not accompanied by return of the B-cell GLUT2 glucose transporter gene expression. *Diabetes*, **41**: 1320-1327.
- Chentoufi A.A. and Polychronakos C. (2002) Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance. The mechanism by which the *IDDM2* locus may predispose to diabetes. *Diabetes*, **51**: 1383-1390.
- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.*, **162**: 156-159.
- Colle E. Guttman R.D., Seemayer T. (1981) Spontaneous diabetes mellitus syndrome in the rat. Association with the major histocompatibility complex. *J.Exp.Med.*, **154**: 1237-1242.
- Cozar-Castellano I., Fiaschi-Taesch N., Bigatel T.A., Takane K.K., Garcia-Ocaña A., Vasavada R. and Stewart A.F. (2006) Molecular control of cell cycle progression in the pancreatic β -cell. *Endocrine Reviews*,**27**:356-370.
- Crisa L., Mordes J.P., Rossini A.A.(1992) Autoimmune diabetes mellitus in the BB rat. *Diabetes Metab*,**8**:4-37.
- Dahl U., Sjödin A. and Semb H. (1996) Cadherins regulate aggregation of pancreatic β -cells in vivo. *Development*, **122**: 2895-2902.
- Daniel D. (1994) Epitope specificity cytokine production profile and diabetogenic activity of insulin-specific T cell clones isolated from the NOD mouse. *Eur.J.Immunol.*, **25**: 1056-1062.
- Daughaday W.H. and Rotwein P. (1989) Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev*, **10**: 68-91.
- De Wet J.R., Wood K.V., DeLuca M., Helinski D.R., Subramani S. (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol.Cell Biol.*, **7**: 725-737.
- Dean B. M., Walker R., Bone A. J., Baird J. D., Cooke A. (1985) Pre-diabetes in the spontaneously diabetic BB/E rat: lymphocyte subpopulations in the pancreatic infiltrate and expression of MHC class II molecules in endocrine cells. *Diabetologia*, **28**: 464-466.
- Deltour L., leduque P., Paldi A., Ripoche M.A., Dubois P. and Jami J. (1991) Polyclonal origin of pancreatic islets in aggregation mouse chimeras. *Development*, **112**: 115-1121.
- Deltour L., Leduque P, Blume N., Madsen O., *et al.* (1993) Differential expression of the two nonallelic proinsulin genes in the developing mouse embryo. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **90**: 527-531.
- Denley A., Wallace J.C., Cosgrove L.J., Forbes B.E. (2003) The insulin receptor isoform Exon 11- (IR-A) in cancer and other diseases: A review. *Horm.Metab.Res.*, **35**:778-785.
- Devedjian J.C., *et al.* (2000) Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor-II in beta cells develop type 2 diabetes. *J.Clin.Invest*, **105**: 731-740.
- Di Cosmo B.F., Picarella D. and Flavell R.A. (1994) Local production of human IL-6 promotes insulinitis but retards the onset of insulin-dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Int.Immunol.*, **6**: 1829-37.
- Donath M.Y., StØrling J., Maedler K. and Mandrup-Poulsen T. (2003) Inflammatory mediators and islet β -cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *J Mol Med*, **81**: 455-470.

- Drummond I.A., Madden S.L., Rohwer-Nutter P. *et al.* (1992) Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. *Science*, **257**: 674-678.
- Dukes I.D., Sreenan S., Roe M.W. (1998) Defective pancreatic beta-cell glycolytic signaling in hepatocyte nuclear factor-1alpha-deficient mice. *J.Biol.Chem.*, **273**: 24457-24464.
- Dupont J. and Holzenberger M. (2003) Biology of insulin-like growth factors in development. *Birth Defects Research*, **69**: 257-271.
- Edlund H. (2001) Developmental biology of the pancreas. *Diabetes*, **50 (Suppl.1)**: S5-S9.
- Ettinger R.A., Liu A.W., Nepom G.T., Kwok W.W. (1998) Exceptional stability of the HLA-DQA1*0102/DQB1*0602 $\alpha\beta$ protein dimer, the class II MHC molecule associated with protection from insulin-dependent diabetes mellitus. *J.Immunol*, **161**: 6439-6445.
- Fantin V.R., Wang Q., Lienhard G.E. & 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**:127-133.
- 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.
- Foulis A.K., Farquharson M.A. (1986) Aberrant expression of HLA-DR antigens by insulin-containing beta-cells in recent-onset type I diabetes mellitus. *Diabetes*, **35**: 1215-1224.
- Foulis A.K., Farquharson M.A., Hardman R. (1987) Aberrant expression of Class II major histocompatibility complex molecules by B cells and hyperexpression of Class I major histocompatibility complex molecules by insulin containing islets in Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, **30**: 333-343.
- Frasca F., *et al.* (1999) Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol. Cell. Biol.*, **19**:3278-3288.
- Freiesleben De Blasio B., Bak P., Pociot F., Karlens A.E. and Nerup J. (1999) Onset of Type 1 diabetes: A dynamical instability. *Diabetes*, **48**: 1677-1685.
- Funzio R., Chiarotti L. *et al.* (1986) Structure and expression of the rat insulin-like growth factor II (rIGF-II) gene. *J.Biol.Chem.*, **261**: 17138-17149.
- Gauthier B., Brun T., Sarret E.J., Ishihara H., *et al.* (2004) Oligonucleotide microarray analysis reveals that PDX1 as an essential regulator of mitochondrial metabolism in rat islets. *J.Biol.Chem.*, **279**: 31121-31130.
- Geenen V., Achour I., Robert F., Vandersmissen E., Sodoyez J.C., Defresne M.P., Boniver J., Lefebvre P.J. and Franchimont P. (1993) Evidence that insulin-like growth factor 2 (IGF2) is the dominant thymic peptide of the insulin superfamily. *Thymus*, **21**: 115-127.
- Geng L., Solimena M., Flavell R.A., Sherwin R.S and Hayday A.C. (1998) Widespread expression of an autoantigen-GAD65 transgene does not tolerize non-obese diabetic mice and can exacerbate disease. *PROC.NATL. ACAD.SCI.*, **95**: 10055-10060.
- George, M., Ayuso, E., Casellas, A., Costa, C., Devedjian, J.C. and Bosch, F. (2002) Beta cell expression of IGF-I leads to recovery from Type 1 diabetes. *J Clin Invest*, **109**: 1153-1163.
- Gerrish K., Gannon M., Shih D., Henderson E., Stoffel M., Wright C.V.E., and Stein R. (2000) Pancreatic β cell-specific transcription of the *pdx-1* gene. *J.Biol.Chem.*, **275**: 3485-3492.
- Gianani R. and Eisenbarth G.S. (2005) The stages of type IA diabetes. *Immunol.Rev.*, **204**:232-249.
- Giannoukakis N., Mi Z., Rudert W.A., Gambotto A., Trucco M. and Robbins P. (2000) Prevention of beta cell dysfunction and apoptosis activation in human islets by adenoviral gene transfer of the insulin-like growth factor I. *Gene Therapy*, **7**: 2015-2022.

- Goto Y., Kakizaki M., Masaki N. *et al.* (1975) Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats. *Proc.Jpn.Acad.*, **51**: 80-85.
- Greiner D.L., Rossini A.A. and Mordes J.P. (2001) Translating data from animal models into methods for preventing human autoimmune diabetes mellitus: Caveat emptor and primum non nocere. *Clin.Immunol.*, **100**: 134-143.
- Gremlich S., Bonny C., Waeber G., Thorens B. (1997) Fatty acids decreases IDX-1 expression in rat pancreatic islets and reduced GLUT2, glucokinase, insulin and somatostatin levels. *J.Biol.Chem.*, **272**: 30261-30269.
- Grewal I.S., Grewal K.D., Wong F.S., Picarella D.E., Janeway C.A. Jr. and Flavell R.A. (1996) Local expression of transgene encoded TFN- α in islets prevents autoimmune diabetes in NOD mice by preventing the development of autoreactive islet specific T cells. *J.Exp.Med.*, **184**: 1597-1600.
- Guberski D.L. (1993) Diabetes-prone and diabetes-resistant BB rats: animal models of spontaneous and virally induced diabetes mellitus, lymphocytic thyroiditis and collagen-induced arthritis. *ILAR Journal*, **35**.
- Guillam M.T., Hümmler E., Schmidt A., Dériaz N., Thorens B. *et al.* (1997) Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islets development in mice lacking GLUT2. *Nat.Genet.*, **17**: 327-220.
- Gunton J.E., Kulkarni R.N., Yim S., Kahn R.C., *et al.* (2005) Loss of *ARNT/HIF1 β* mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human Type 2 diabetes. *Cell*, **122**: 337-349.
- Habener J.F., Kemp D.M. and Thomas M.K. (2005) Minireview:Transcriptional Regulation in Pancreatic Development. *Endocrinology*, **146**:1025-1034.
- Haeften T.W., Twickler Th.B. (2004) Insulin-like growth factors and pancreas beta cells. *European Journal of Clinical Invest.*, **34**: 249-255.
- Han V.K., Lund P.K., Lee D.C. and D'Ercole A.J. (1988) Expression of somatomedin/insulin-like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus: identification, characterization, and tissue distribution. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, **66**: 422-429.
- Hanafusa T., Fujino-Kurihara H., Miyazaki A., Yamada K., Nakajima H., Miyagawa J., Kono N. and Tarui S. (1987) Expression of class II major histocompatibility complex antigens on pancreatic B cells in the NOD mouse **30**: 104-108.
- Harmon J.S., Stein R. and Robertson R.P. (2005) Oxidative stress-mediated, post-transcriptional loss of MafA protein as a contributing mechanism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells. *J.Biol.Chem.*, **280**: 11107-11131.
- Harris P.E., Malanga D., Liu Z., Hardy M.A., Souza F., Del Pozzo G., Winchester R.J. and Maffei A. (2006) Effect of interferon alpha on MHC class II gene expression in ex vivo human islet tissue. *Biochimica et Biophysica Acta.*, **1762**: 627-635.
- Hauge-Evans AC, Squires PE, Persaud SJ, Jones PM. (1999) Pancreatic beta-cell-to-beta-cell interactions are required for integrated responses to nutrient stimuli: enhanced Ca²⁺ and insulin secretory responses of MIN6 pseudoislets. *Diabetes*, **48(7)**:1402-8.
- Haverkos H.W. (1997) Could the etiology of IDDM be multifactorial? *Diabetologia*, **40**: 1235-1240.
- Hawkes C.& Kar S.(2004) The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system. *Brain Research Reviews*, **44**:117-140.
- 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.
- Herr R.R., Jahnke A.D., Argoudelis A.D.(1967) The structure of Streptozotocin. *J.Am.Chem.Soc.*, **89**: 4808-09.

- Higuchi Y., Herrera P., Muniesa P., *et al.* (1992) Expression of a tumor necrosis factor α transgene in murine pancreatic β cells results in severe and permanent insulinitis without evolution towards diabetes. *J.Exp.Med.*, **176**: 1719-1731.
- Hill D.J., Strutt B., Arany E., Zaina S., Coukell S. and Graham C.F. (2000) Increased and persistent circulating insulin-like growth factor II in neonatal transgenic imce suppresses developmental apoptosis in the pancreatic islets. *Endocrinology*, **141**: 1151-1157.
- 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.*, **69**: 2351-2353.
- Hitman G.A., Tarn A.C., Winter R.M. *et al.* (1985) Type 1 (insulin-dependent) diabetes and a highly variable locus close to the insulin gene on chromosome 11. *Diabetologia*, **28**: 218-222.
- Hogg J., Han V.K.M., Clemmons D.R. and Hill D.J. (1993) Interactions of nutrients, insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins in the regulation of DNA synthesis by isolated fetal rat islets of Langerhans. *J.Endocrinol.*, **138**: 401-412.
- Holst B.D., Wang Y., Jones F.S. and Edelman G.M. (1997) A binding site for Pax proteins regulates expression of the gene for the neural cell adhesion molecule in the embryos spinal cord. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **94**: 1465-1470.
- Homo-Delarche F., Calderari S., Halban P., Portha B., Serradas P., *et al.* (2006) Islet inflammation and fibrosis in a spontaneous model of type 2 diabetes, the GK rat. *Diabetes*, **55**: 1625-1633.
- Höög, A. *et al.* (1996) Increased amounts of a high molecular weight insulin-like growth factor II (IGF-II) peptide and IGF-II messenger ribonucleic acid in pancreatic islets of diabetic Goto-Kakizaki rats. *Endocrinology*, **137**: 2415-2423.
- Hosokawa M., Dolci W. and Thorens B. (2001) Differential sensitivity of GLUT1- and GLUT2-expressing β cells to streptozotocin. *Biochem. and Biol.Research Comm.*, **289**: 1114-1117.
- Huang X. *et al.* (1994) Interferon expression in the pancreas of patients with type I diabetes. *Diabetes*, **44**: 658-664.
- Huopio H., Shyng S.L., Otonkoski T., Nichols C.G. (2002) K(ATP) channels and insulin secretion disorders (Review). *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.*, **283**: E207-E216.
- Imagawa A, Hanafusa T., Tamura S., Moriwaki M., *et al.* (2001) Pancreatic biopsy as a procedure for detecting in situ autoimmune phenomena in type 1 diabetes. Close correlation between serological markers and histological evidence of cellular autoimmunity. *Diabetes*, **50**: 1269-1273.
- Itoh N., Hanafusa T., Miyazaki A., Miyagawa J., Yamagata K., Yamamoto K., Waguri M., Imagawa A. *et al.* (1993) Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J.Clin.Invest.*, **92**: 2313-2322.
- Jackson R., Rassi N., Crump A., Haynes B.F., Eisenbarth G.S. (1981) The BB diabetic rat. Profound T-cell lymphocytopenia. *Diabetes*, **30**: 887-889.
- Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.J. (2003) *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad.* 3ª edición, Masson, Barcelona.
- Jensen J., Serup P., Nielsen T.F., Madsen O.D. (1996) mRNA profiling of rat islet tumors reveals nkx6.1 as a β -cell specific homeodomain transcription factor. *J.Biol.Chem.*, **271**: 18749-18758.
- Johnson J.H., Ogawa A., Chen L., Orci L., Unger R.H. *et al.* (1990) Underexpression of β -cell high K_m glucose transporters in non-insulin-dependent diabetes. *Science*, **250**: 546.

- Jonas J-C., Sharma A., Hasenkamp W., Ilkova H., Patane G., Laybutt R., Bonner-Weir S., Weir G.C. (1999) Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J.Biol.Chem.*, **274**: 1447-1457.
- Jones J.I., Doerr M.E. and Clemmons D.R. (1995) Cell migration: Interactions among integrins, IGFs and IGFs. *Prog Growth Factor Res*, **6**: 319-327.
- Jonsson J., Carlsson L., Edlund T, Eldlund H. (1994) Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*, **371**: 606-609.
- 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.
- Kahn C.R. (1985) The molecular mechanism of insulin action. *Ann.Rev.Med.*, **36**: 429-251.
- Kahn S.E. (2001) Clinical Review 135. The importance of β -cell failure in the development and progression of Type 2 Diabetes. *J.Clin.Endocrinol. & Metab*, **86(9)**: 4047-4058.
- Kaneto H., Xu G., Nobuharu F., Kimi S., Bonner-Weir S. and Weir G.C. (2002) Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression. *J.Biol. Chem.*, **277**: 30010-30018.
- Kataoka K., Han S.I., Shioda S., Hirai M., Nishizawa M. and Handa H. (2002) MafA is a glucose-regulated and pancreatic beta-cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *J.Biol.Chem.*, **277**: 49903-49910.
- Kauffmann-Zeh A., Rodriguez-Viciano P., Ulrich E., Gilbert C., Coffey P., Downward J. and Evan G. (1997) Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signaling through PI(3)K and PKB. *Nature*, **385**: 544-548.
- Kawamori D., Kajimoto Y., Kaneto H., *et al.* (2003) Oxidative stress induces nucleo-cytoplasmic translocation of pancreatic transcription factor PDX-1 through activation of c-Jun NH₂-terminal kinase. *Diabetes*, **52**: 2896-2904.
- Kido Y., Burks D.J., Withers D., Bruning J.C., Kahn C.R., White M.F. & Accili D. (2000) Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest*, **105**: 199-205.
- Kim K-A., Kim S., Chang K., Kim G.S., Min Y-K, Lee M-K., Kim K-W, Lee M-S. (2002) IFN γ /TNF α synergism in MHC class II induction: effect of nicotinamide on MHC class II expression but not on islet-cell apoptosis. *Diabetologia*, **45**: 385-393.
- Kulkarni R.N. *et al.* (1999) Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic β cells creates an insulin secretory defect similar to that in Type 2 diabetes. *Cell*, **96**: 329-339.
- Kulkarni R.N. *et al.* (2002) Beta-cell specific deletion of the Igf1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter beta-cell mass. *Nat.Genet.*, **31**: 111-115.
- Kulkarni R.N., Jhala U.S., Winnay J.N., Krajewski S., Montminy M. and Kahn R.C. (2004) PDX-1 haploinsufficiency limits the compensatory islet hyperplasia that occurs in response to insulin resistance. *J.Clin.Invest.*, **114**: 282-836.
- Kulkarni R.N. & Kahn R. (2004) HNFs—linking the liver and pancreatic islets in diabetes. *Science*, **303**: 1311-1312.
- Kwok W.W., Domeier M.E., Raymond F.C., Byers P., Nepom G.T. (1996) Allele-specific motifs characterize HLA-DQ interactions with a diabetes-associated peptide derived from glutamic acid decarboxylase. *J.Immunol.*, **156**: 2171-2177.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- 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.*, **93**: 6367-6370.

- Lantz K.A., Vatamaniuk M.Z., Matschinsky F.M., Kaestner K.H., *et al.* (2004) *Foxa2* regulates multiple pathways of insulin secretion. *J.Clin.Invest.*, **114**: 512-520.
- Laybutt D.R., Kaneto H., Hasenkamp W., Ferran C., Bonner-Weir S., Sharma A., Weir G.C., *et al.* (2002) Increased expression of antioxidant and antiapoptotic genes in islets that may contribute to beta-cell survival during chronic hyperglycemia. *Diabetes*, **51**: 213-223.
- Laybutt D.R., Glandt M., Xu G., Ahn Y.B., Trivedi N., Bonner-Weir S. and Weir G.C. (2003) Critical reduction in β -cell mass results in two distinct outcomes over time. *J.Biol.Chem.*, **278(5)**: 2997-3005.
- Le Roith D. (1997) Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med*, **336**: 633-640.
- Lee Y.H., Sauer B., Gonzalez F.J. (1998) Laron dwarfism and non-insulin-dependent diabetes mellitus in the Hnf-1 α knock-out mouse. *Mol.Cell.Biol.*, **18**: 3059-3068.
- Lee C.S., Sund N.J., Vatamaniuk M.Z., Matschinsky F.M., Stoffers D.A. and Kaestner K.H. (2002) *Foxa2* controls *Pdx1* gene expression in pancreatic β -cells in vivo. *Diabetes*, **51**: 2546-2551.
- LeibundGut-Landmann S., Waldburger J.M., *et al.* (2004) Mini-review: specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur.J.Immunol.*, **34**: 1513-1525.
- Like A.A. and Rossini A.A. (1976) Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: New model of diabetes mellitus. *Science*, **193**: 415-417.
- Lingohr M.K., Dickson L.M., McCuaig J.F., Hugl S.R., Twardzik D.R., Rhodes C.J. (2002) Activation of IRS-2-mediated signal transduction by IGF-1, but not TGF- α or EGF, augments pancreatic β -cell proliferation. *Diabetes*, **41**: 966-976.
- Lo D., Burkly L.C., Widera G., Coming 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.
- Lucassen A.M. *et al.* (1993) Susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1-kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR. *Nature Genet.*, **4**: 305-310.
- Lukic M.L., Stosic-Grujicic S. and Shahin A. (1998) Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Dev.Immunol.*, **6**:119-128.
- Luzi L. and DeFronzo R.A. (1989) Effect of loss of first-phase insulin secretion on hepatic glucose production and tissue glucose disposal in humans. *Am.J.Physiol.*, **257**:241-246.
- Mabley J.G., Belin V., John N. and Green I.C. (1997) Insulin-like growth factor I reverses interleukin-1 β inhibition of insulin secretion, induction of nitric oxide synthase and cytokine-mediated apoptosis in rat islets of langerhans. *FEBS Lett.*, **417**: 235-238.
- Maclean N., Ogilvie R.F. (1995) Quantitative estimation of the pancreatic islet tissue in diabetic subjects. *Diabetes*, **4**: 367-376.
- MacMurray A.J., Moralejo D.H., Kwitek A.E., Rutledge E.A., Van Yserloo B., Gohlke P. *et al.* (2002) Lymphopenia in the BB rat model of type 1 diabetes is due to a mutation in a novel immune-associated nucleotide (lan)-related gene. *Genome Res.*, **12**: 1029-1039.
- Maedler K., Spinas G.A., Lehmann R. *et al.* (2001) Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the fas receptor in human islets. *Diabetes*, **50**: 1683-1690.
- Maedler K., Sergeev P., Ris F., Donath M.Y. *et al.* (2002) Glucose-induced beta cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J.Clin.Invest.*, **110**: 851-860.

- Makino S., 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.
- Malecki M.T., Jhala U.S., Antonellis A. *et al.* (1999) Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nature Genet.*, **23**: 323-328.
- Mandrup-Poulsen T. (2003) Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochemical Pharmacology*, **66**:1433-1440.
- Massague J. and Czech M.P. (1982) The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. *J Biol Chem*, **257**: 5038-5045.
- Mathis D., Vence L. and Benoist,C. (2001) β -cell death during progression to diabetes. *Nature*, **414**: 792-798.
- Matsuoka T.A., Arner I., Henderson E., Means A., Sander M., and Stein R. (2004) The mafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **101**: 2930-2933.
- Moller D.E., Yokota A., Caro J.F., and Flier J.S. (1989) Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol. Endocrinol*, **3**:1263–1269.
- Morrione, A., *et al.* (1997) Insulin-like growth factor II stimulates cell proliferation through the insulin receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **94**: 3777–3782.
- Motzo C., Contu D., Cordell H., Lampis R., Congia M., Marrosu M.G., Todd J.A., *et al.* (2004) Heterogeneity in the magnitude of the insulin gene effect on HLA risk in type 1 diabetes. *Diabetes*, **53**: 3286-3291.
- Mueller R., Krahl T. and Sarvetnick N. (1996) Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *J.Exp.Med.*, **184**: 1093-1099.
- 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.
- Nakhooa A.F., Like A.A., Chappel C.I., Murray F.T., Marliss B. (2001) The spontaneously diabetic Wistar rat: metabolic and morphologic studies. *Diabetes*, **26**: 100-112.
- Naya F.J., Stellrecht C.M.M., Tsai M-J. (1995) Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev*, **9**:1009-1019.
- Naya F.J., Huang H-P., Qiu Y., Mutoh H., DeMayo F.J., Leiter A.B., Tsai M.J. (1997) Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/NEUROD-deficient mice. *Genes Dev*, **11**: 2323-2334.
- Nepom G.T., Kwok W.W. (1998) Molecular basis for HLA-DQ associations with IDDM. *Diabetes*,**47**:1177-84.
- Nielsen J., Christiansen J., Lykke-andersen J., *et al.* (1999) A family of Insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Molecular and Cellular Biol.*, **19**: 1262-1270.
- Notkins A.L. and Lernmark A. (2001) Autoimmune type 1 diabetes: Resolved and unresolved issues. *J.Clin.Invest.*, **108**: 1247-1252.
- O'Brien B.A., Harmon B.V., Cameron D.P. and Allan D.J. (1996) Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *J.Pathol.*, **178**: 176-181.
- Odom D.T., Zizlsperger N., Gordon B., Bell G.W., Young R.A., *et al.* (2004) Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science*, **303**: 1378-1381.
- Offield M.F., Ray M., Stein R., Magnuson M.A., Wright C.V.E., *et al.* (1996) PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development*, **122**: 983-995.
- Ohlsson H., Thor S and Eldund T. (1991) Novel insulin promoter- and enhancer-binding proteins that discriminate between pancreatic alpha- and beta-cells. *Molecular Endocrinology*, **5**:897-904.

- Ohneda K., Ee H. and German M. (2000) Regulation of insulin gene transcription. *Seminars in Cell & Dev. Biol.*, **11**: 227–233.
- Olbrot M., Rud J., Moss L.G. and Sharma A. (2002) Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3bs as mammalian MafA. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **99**: 6737-6742.
- Orci L., Ravazzola M., Baetens D., Unger R.H. *et al.* (1990)(b) Evidence that down-regulation of β -cell glucose transporters in non-insulin-dependent diabetes may be the cause of diabetic hyperglycemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, **87**: 9953-9957.
- Orci L., Unger R.H., Ravazzola M. *et al.* (1990) (a) Reduced beta-cell glucose transporter in new onset diabetic BB rats. *J.Clin.Invest.*, **86**: 1615-1622.
- Oxombre B., Moerman E., Eeckhoute J., Formstecher P. and Laine B. (2002) Mutations in hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) gene associated with diabetes result in greater loss of HNF4 α function in pancreatic β -cells than in nonpancreatic β -cells and in reduced activation of the apolipoprotein CIII promoter in hepatic cells. *J.Mol.Med.*, **80**: 423-430.
- Palmer J.P. (1987) Insulin autoantibodies: their role in the pathogenesis of IDDM. *Diabetes Metab.Rev.*, **3**: 1005-1015.
- Paquette J., Giannoukakis N., Polychronakos C., Vafiadis P. and Deal C. (1998) The *INS* 5' variable number of tandem repeats is associated with *IGF2* expression in humans. *J.Bio.Chem.*, **273**: 14158-14164.
- 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.
- Pelegri M., Devedjian J.C., Costa C., Visa J., Solanes G., Pujol A., Asins G., Valera A. and Bosch F. (1998) Evidence from transgenic mice that interferon-beta may be involved in the onset of diabetes mellitus. *J Biol Chem*, **273**: 12332-12340.
- Petersen H.V., Serup P., Leonard J., Michelsen B.K., Madsen O.D. (1994) Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **91**: 10465-10469.
- Petrik J., Arany E. and Hill. D.J. (1998) Apoptosis in the pancreatic islet cells of the neonatal rat is associated with a reduced expression of insulin-like growth factor II that may act as a survival factor. *Endocrinology*, **139**: 2994-3004.
- Peyton M., Moss L.G., Tsai M.J. (1994) Two distinct class A helix-loop-helix transcription factors, E2A and BETA1, form separate DNA binding complexes on the insulin gene E box. *J.Biol.Chem.*, **269**: 25936-25941.
- Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **29**: e45.
- Picarella D.E., Kratz A., Li C., Ruddle N.H. and Flavell R.A. (1993) Transgenic tumor necrosis factor (TNF)- α production in pancreatic islets leads to insulinitis, not diabetes: Distinct patterns of inflammation in TNF- α and TNF- β transgenic mice. *J.Immunol.*, **150**: 4136-4150.
- Pick A., Clark J., Kubstrup C., Pugh W., *et al.* (1998) Role of apoptosis in failure of beta cell mass compensation for insulin resistance and β cell defects in the male Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. *Diabetes*, **47**: 358-364.
- Pickup J.C., Crook M.A. (1998) Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia*, **41**: 1241-1248.
- Pickup J. & Williams G. (2003) *Textbook of Diabetes, 3rd edition, Volum 1.* Series editor Blackwell Science Ltd.
- Pietropaolo M., Barinas-Mitchell E., Pietropaolo S.L., Kuller L.H. and Trucco M. (2000) Evidence of islet cell autoimmunity in elderly patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, **49**:32-38.

- Poitout V., Stein R., Rhodes C.J. (2004) Insulin Gene Expression and Biosynthesis. Chapter 6: 97-123. *International Textbook of Diabetes Mellitus, Third Edition, Volum 1*. Edited by R.A. DeFronzo, E. Ferrannini, H.Keen and P.Zimmet. John Wiley & Sons, Ltd.
- Polychronakos C., Kukuvtis A., Giannoukakis N., Colle E. (1995) Parental imprinting effect at the *INS-IGF2* diabetes susceptibility locus. *Diabetologia*, **38**: 715-719.
- Pontoglio M., Sreenan S., Roe M., Levisetti M., Bonner-Weir S., Bell G.I., Yaniv M. and Polonsky K.S. *et al.* (1998) Defective insulin secretion in hepatocyte nuclear factor-1 α deficient mice. *J.Clin.Invest*, **101(10)**:2215-2222.
- Portela-Gomez G.M. and Höög A. (2000) Insulin-like growth factor II in human fetal pancreas and its co-localization with the major islet hormones: comparison with adult pancreas. *J.Endocrinol.*, **165**: 245-251.
- Pugliese A., Zeller M., Fernandez A.Jr., Zalcberg L.J., Bartlett R.J., Ricordi C., Pietropaolo M., Eisenbarth G.S., Bennett S.T. and Patel D.D. (1997) The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variations at the INS VNTR-IDD3 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat.Genet.*, **15 (3)**: 293-297.
- Puigserver P., Rodgers J.T. (2006) Foxa2, a novel transcriptional regulator of insulin sensitivity. *Nature Medicine*, **12 (1)**: 38-39.
- Rabinovitch A., Quigley C., Russell T., Patel Y. and Mintz D.H. (1982) Insulin and multiplication stimulating activity (an insulin-like growth factor) stimulate islet beta-cell replication in neonatal rat pancreatic monolayer cultures. *Diabetes*, **31**:160–164.
- Rabinovitch A. (1998) An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab.Rev.*, **14**: 129-151.
- Rabinovitch A. & Suarez-Pinzon W.L. (1998) Cytokines and their roles in pancreatic islet β -cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochemical Pharmacology*, **55**: 1139-1149.
- Rabinovitch A. & Suarez-Pinzon W.L. (2003) Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, **4**: 291-299.
- Raum J.C., Gerrish K., Artner I., Stein R., *et al.* (2006) FoxA2, Nkx2.2, and PDX-1 regulate islet β -cell-specific *mafA* expression through conserved sequences located between base pairs -8118 and -7750 upstream from the transcription start site. *Mol.Cell.Biol.*, **26**: 5735-5743.
- Reddy S., Young M., Poole C.A. and Ross J.M. (1998) Loss of glucose transporter-2 precedes insulin loss in the Nonobese Diabetic and the Low-Dose streptozotocin mouse models: a comparative immunohistochemical study by light and confocal microscopy. *General and Comparative Endocrinology*, **111**: 9-19.
- Reith W., LeibundGut-Landmann S and Waldburger J-M. (2005) Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nature Rev. Immunol*, **5**: 793-806.
- Robertson R.P. (2006) Oxidative stress and impaired insulin secretion in type 2 diabetes. *Current opinion in Pharmacology*, **6**: 1-5.
- Rogler C.E., Yang D., Rossetti L., *et al.* (1994) Altered body composition and increased frequency of diverse malignancies in Insulin-like growth factor-II transgenic mice. *J.Biol.Chem.*,**269**:13779-13784.
- Rosen C.J. (1999) Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins: clinical implication. *Clin.Chem.*, **45**: 1384-1390.
- Rossini A.A., Appel M.C., Williams R.M. and Like A.A. (1977) Genetic influence of the streptozotocin- induced insulinitis and hyperglycemia. *Diabetes*, **26**: 916-920.
- Rother K.I., Iman Y., Caruso M., Beguinot F., Formisano P., Accili D. (1998) Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes. *J.Biol.Chem.*, **273**: 17491-17497.

- Rother K.I., Accili D. (2000) Role of insulin receptors and IGF receptors in growth and development. *Pediatr.Nephrol.*, **14**: 558-561.
- Rotwein P., Yokoyama S., Didier D.K., Chirgwin J.M. (1986) Genetic analysis of the hypervariable region flanking the human insulin gene. *Am.J.Hum.Genet.*, **39**: 291-299.
- Saltiel A.R. and Kahn C.R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, **414**: 799-806.
- Samaras S.E., Zhao L., Means A., Henderson E., Matsuoka T. and Stein R. (2003) The islet β cell-enriched RIPE3b1/Maf transcription factor regulates *pdx-1* expression. *J.Biol.Chem.*, **278**:12263-270.
- Sander M., and German M.S. (1997) The beta cell transcription factors and development of the pancreas. *J.Mol.Med.*, **75**: 327-340.
- Sander M., Neubuser A., Kalamaras J., Ee H.C., Martin G.R., German M.S. (1997) Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development, *Genes Dev.*, **11**: 1662-1673.
- Sander M., Sussel L., Connors L., Scheel D., Kalamaras J., Dela Cruz F., Schwitzgebel V., Hayes-Jordan A. and German M. (2000) Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas. *Development*, **127**: 5533-5540.
- Sanvito F., Nichols A., Herrera P.-L., *et al.* (1995) TGF- β 1 overexpression in murine pancreas induces chronic pancreatitis and, together with TNF- α , triggers insulin-dependent diabetes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **217**: 1279-1286.
- 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., Shizuru J., Liggitt D., Martin L., McIntyre B., Gregory A., *et al.* (1990) Loss of pancreatic islet tolerance induced by beta-cell expression of interferon-gamma. *Nature*, **346**: 844-847.
- Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Ricke D, Purcell S., *et al.* (2007) Genome-Wide Association Analysis Identifies Loci for Type 2 Diabetes and Triglyceride Levels. *Science*, **Apr 26**; *online publication*.
- Scaglia L., Cahill C.J., Finegood D.T. and Bonner-Weir S. (1997) Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology*, **138**: 1736-1741.
- 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.
- Schrezenmeir J. and Jagla A. (2000) Milk and diabetes. *J.Am.Coll.Nutr.*, **19**: 176S-190S.
- Scott L.J., Mohlke K.L., Bonnycastle L.L., Collins F.S., Boehnke M. *et al.* (2007) A Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Finns Detects Multiple Susceptibility Variants. *Science*, **Apr 26**; *online publication*.
- Seino S., Seino M., Nishi S., Bell G.I. (1989) Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **3**: 114-118.
- Servitja J.M. and Ferrer J. (2004) Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function. *Diabetologia*, **47(4)**: 597-613.
- Shieh S-Y., Tsai M-J. (1991) Cell-specific and ubiquitous factors are responsible for the enhancer activity of the rat insulin II gene. *J.Biol.Chem.*, **266**: 16708-16714.
- Shih D.Q., Heimesaat M., Kuwajima S., Stein R., Wright C.V., Stoffel M. (2002) Profound defects in pancreatic beta-cell function in mice with combined heterozygous mutations in Pdx-1, Hnf-1alpha and Hnf-3beta. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **99 (6)**: 3818-3823.

- Signore A., Cooke A., Pozzilli P., Butcher G., Simpson E., Beverly P.C. (1987) Class-II and IL-12 receptor positive cells in the pancreas of NOD mice. *Diabetologia*, **30**: 902-905.
- Singal D.P., Blajchman M.A. (1973) Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. *Diabetes*, **22**: 429-432.
- Smith F.E., Rosen K.M., Villa-Komaroff L., Weir G.C. & Bonner-Weir S. (1991) Enhanced insulin-like growth factor I gene expression in regenerating rat pancreas. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **88**: 6152-6156.
- Somoza N., Vargas F., Roura-Mir C. *et al.* (1994) Pancreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus: changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor V beta usage, and cytokine profile. *J.Immunol.*, **153**: 1360-1370.
- Sorhede Winzell M., Magnusson C. and Ahren B. (2005) The ajp receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regul.Pept.*, **131 (1-3)**: 12-17.
- Spranger J., Kroke A., Mohlig M. *et al.* (2003) Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Postdam Study. *Diabetes*, **52**: 812-817.
- Starborg M., Gell K., Brundell E., Hogg C. (1996) The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J.Cell.Sci.*, **109**: 143-153.
- Steimle V. *et al.* (1994) Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science*, **265**: 106-109.
- Steiner D.F., Bell G.I., Tager H.S. (1989) *Endocrinology*, p.1263. Series Editor W.B. Saunders, Philadelphia.
- Stewart T.A., Hultgren B., Huang X., Pitts-Meek S., *et al.* (1993) Induction of type 1 diabetes by interferon- α in transgenic mice. *Science*, **260**: 1942-1946.
- Stoffers D.A., Zinkin N.T., Stanojevic V., Clarke W.L., Habener J.F. (1997) Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF-1. *Nature Genet.*, **17**: 138-139.
- Sund N.J., Vatamaniuk M.Z., Casey M., Ang S-L. *et al.* (2001) Tissue-specific deletion of *Foxa2* in pancreatic β cells results in hyperinsulinemic hypoglycemia. *Genes & Development*, **15**:1706-1715.
- Sussel L., Kalamaras J., Hartigan-O'Connor D.J., Meneses J.J., Pedersen R.A., Rubenstein J.L., German M.S. (1998) Mice lacking the homeodomain transcription factor *Nkx2.2* have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic β cells. *Development*, **125**: 2213-2221.
- Syed M.A., Barinas-Mitchell E., Pietropaolo S.L. *et al.* (2002) Is type 2 diabetes a chronic inflammatory/autoimmune disease? *Diabetes Nutr.Metab.*, **15**: 68-83.
- Tamemoto H., *et al.* (1994) Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*, **372**: 182-186.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (1997) Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, **20**: 1183-1197.
- Thorens B., Wu Y.J., Leahy J.L., Weir G.C. (1992) The loss of GLUT2 expression by glucose unresponsive beta cells of db/db mice is reversible and is induced by the diabetic environment. *J.Clin.Invest.*, **90**: 77-85.
- Ting J.P., Trowsdale J. (2002) Genetic control of MHC class II expression. *Cell*, **153(Suppl.)**: S21-S33.
- Todd J.A., Farrall M. (1996) Panning for gold: genome-wide scanning for linkage in type 1 diabetes. *Hum. Mol.Genet.*, **5**: 1443-1448.
- Tokuyama, Y., Sturis, J., DePaoli, A.M. *et al.* (1995) Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes*, **44 (12)**: 1447-1457.

- Tussey L.G., McMichael A.J. (1995) General introduction to the MHC. Modulation of MHC antigen expression and disease. *Cambridge University Press*: 1-26.
- Ueki K., Okada T., Hu J., Kahn R.C., Kulkarni R.C., *et al.* (2006) Total insulin and IGF-I resistance in pancreatic β cells causes overt diabetes. *Nat.Genet.*, **38**: 583-586.
- Undlien D.E., Bennett S.T., Todd J.A., Akselsen H.E., *et al.* (1995) Insulin gene region-encoded susceptibility to IDDM maps upstream of the insulin gene. *Diabetes*, **44**: 620-625.
- Unger R.H. (1991) Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells. *Science*, **251**: 1200-1205.
- Verge C.F., Gianani R., Kawasaki E., Yu L., Peitropaolo M., Jackson R.A. *et al.* (1996) Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*, **45**: 926-933.
- Vafiadis P., Bennett S.T., Colle E., Polychronakos C., *et al.* (1996) Imprinted and genotype-specific expression of genes at the *IDDM2* locus in pancreas & leucocytes. *J.Autoimm.*, **9**:397-403.
- Vafiadis P., Bennett S.T., Todd J.A., Colle E., Polychronakos C., *et al.* (1997) Insulin expression in human thymus is modulated by *INS VNTR* alleles at the *IDDM2* locus. *Nat.Genet.*, **15**: 289-292.
- Vafiadis P., Grabs R., Goodyer C.G., Colle E. and Polychronakos C. (1998) (a) A functional analysis of the role of *IGF2* in *IDDM2*-encoded susceptibility to Type 1 Diabetes. *Diabetes*, **47**: 831-836.
- Vafiadis P., Bennett S.T., Todd J.A., Grabs R. and Polychronakos C. (1998) (b) Divergence between genetic determinants of *IGF2* transcription levels in leukocytes and of *IDDM2*-encoded susceptibility to Type 1 Diabetes. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, **83**: 2933-2939.
- Vafiadis P., Ounissi-Benkhalha H., Palumbo M., Grabs R., Rousseau M., Goodyer C.G. and Polychronakos C. (2001) Class III alleles of the variable number of tandem repeats insulin polymorphism associated with silencing of thymic insulin predispose to type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, **86(8)**: 3705-10.
- van Dijk M.A., van Schaik F.M., Bootsma H.J., Holthuizen P, Sussenbach J.S. (1991) Initial characterization of the four promoters of the human insulin-like growth factor II gene. *Mol.Cell.Endocrinol.*, **81**: 81-94.
- Verges C.F., Gianani R., Kawasaki E., Yu L., Pietropaolo M., Jackson R.A. *et al.* (1996) Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*, **45**: 926-933.
- Von Herrath M.G., Guerder S., Lewicki H., Flavell RA, Oldstone MB. (1995) Coexpression of B7-1 and viral ("self") transgenes in pancreatic beta cells can break peripheral ignorance and lead to spontaneous autoimmune diabetes. *Immunity*, **3(6)**:727-38.
- Waeber G., Thomson N., Nicod P., Bonny C. (1996) Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Molecular Endocrinology*, **10**:1327-1334.
- Walter U., Toepfer T., Dittmar K.E. (2003) Pancreatic NOD beta cell express MHC class II protein and the frequency of Ig-A(g7) mRNA-expressing beta cells strongly increases during progression to autoimmune diabetes. *Diabetologia*, **46**: 1106-1114.
- Wang H., Maechler P., Hagenfeldt K.a., Wollheim C.B. (1998) Dominant-negative suppression of HNF-1 α function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism-secretion coupling in a pancreatic beta-cell line. *EMBO J.*, **17 (22)**: 6701-6713.
- Wang Y., Pontesilli O, Gill R.G., La Rosa F.G., Lafferty K.J. (1991) The role of CD4+ and CD8+ T cells in the destruction of islet grafts by spontaneously diabetic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.***88**:527-531.
- Wang H., Brun T., Kataoka K., Sharma A.J. and Wollheim C.B. (2007) MAFA controls genes implicated in insulin biosynthesis and secretion. *Diabetologia*, **50**: 348-358.

- Watada H., Kajimoto Y., Kaneto H., Matsuoka T., Fujitani Y., Miyazaki J., Yamasaki Y. (1996) (a) Involvement of the homodomain-containing transcription factor PDX-1 in islet amyloid polypeptide gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun*, **229**: 746-751.
- Watada H., Kajimoto Y., Miyagawa J., Hanafusa T., Hamaguchi K., Matsuoka T., Yamamoto K., Matsuzawa Y., Kawamori R., Yamasaki Y. (1996) (b) PDX-1 induces insulin and glucokinase gene expressions in α TC1 clone 6 cells in the presence of betacellulin. *Diabetes*, **45**: 1826-1831.
- Weir G.C., Laybutt D.R., Kaneto H., Bonner-Weir S. and Sharma A. (2001) β -cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes*, **50 (Suppl. 1)**: S154-S159.
- Weir G.C. and Bonner-Weir S. (2004) Five stages of evolving β -cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes*, **53 (Suppl. 3)**: S16-S21.
- Wen L., Wong F.S., Tang J., Chen N.Y., Altieri M., David C., Flavell R. And Sherwin R. (2000) In vivo evidence for the contribution of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DQ molecules to the development of diabetes. *J.Exp.Med.*, **191**: 97-104.
- Wentworth B.M., Schaeffer K.M., Villa-Komaroff L., Chirgwin J.M. (1986) Characterization of the two non-allelic genes encoding mouse preproinsulin. *J.Mol.Evol.*, **23**: 305-312.
- White M.F. (1998) The irs-signalling system: A network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem*, **182**: 3-11.
- Wicker L.S., Miller B.J., Mullen Y. (1986) Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetes*, **35**: 855-860.
- Wickers L.S., Todd J.A., Peterson L.B. (1995) Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu.Rev.Immunol.*, **13**: 179-200.
- Wilkin T.J. (2001) The accelerator hypothesis: weight gain as the missing link between type 1 and type 2 diabetes. *Diabetologia*, **44**: 914-922.
- Wilson 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.
- Wilson M.E., Scheel D., German M.S. (2003) Gene expression cascades in pancreatic development. *Mechanisms of Development*, **120**: 65-80.
- Withers D.J., et al. (1998) Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, **391**: 900-904.
- Wogensen L., Huang X. and Sarvetnick N. (1993) Leukocyte extravasation into the pancreatic tissue in transgenic mice expressing interleukin 10 in the islets of Langerhans. *J.Exp.Med.*, **178**: 175-185.
- Wogensen L., Lee M.-S. and Sarvetnick N. (1994) Production of interleukin 10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of β cells in nonobese diabetic mice. *J.Exp.Med.*, **179**: 1379-1384.
- Wolfrum C., Asilmaz E., Luca E., Friedman J.M. and Stoffel M. (2004) Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature*, **432**: 1027-1032.
- 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. *Nature Med.*, **5**: 1026-1031.
- Wu K.L., Gannon M., Peshavaria M., Offield M.F., Henderson E., Ray M., Marks A., Gamer L.W., Wright C.V., Stein R. (1997) Hepatocyte nuclear factor 3 β is involved in pancreatic beta-cell specific transcription of the pdx-1 gene. *Mol.Cell Biol.*, **17**: 6002-6013.
- Xuan S., et al. (2002) Defective insulin secretion in pancreatic beta cells lacking type 1 IGF receptor. *J.Clin.Invest.*, **110**: 1011-1019.

- Yamagata K., Oda N., Kaisaki P.J. *et al.* (1996) Mutations in the hepatocytes nuclear factor-1 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature*, **384**: 455-458.
- Yamagata K., Furuta H., Oda N. *et al.* (1996) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature*, **384**: 458-460.
- Yamaoka T., Itakura M. (1999) Development of pancreatic islets. *Int.J.Mol.Med.*, **3**:247-261.
- Yoon J.W., Jun H.S. (2001) Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **928**: 200-211.
- Zapf J., Schoenle E. and Froesch E.R. (1978) Insulin-like growth factors I and II: some biological actions and receptors binding characteristics of two purified constituents of nonsuppressible insulin-like activity of human serum. *Eur.J.Biochem.*, **87**: 285-296.
- Zeggini E., Weedon M.N., Lindgren C.M., Doney A.S., McCarthy M.I. and Hattersley A.T., *et al.* (2007) Replication of Genome-Wide Association Signals in U.K. Samples Reveals Risk Loci for Type 2 Diabetes. *Science*. **Apr 26**; *online publication*.
- Zekzer D. *et al.* (1998) GAD-reactive CD4+ Th1 cells induce diabetes in NOD/SCID mice. *J.Clin.Invest.*, **101**: 68-73.
- Zhang Q., Tally M., Larsson O. *et al.* (1997) Insulin-like growth factor II signaling through the insulin-like growth factor II/ mannose-6-phosphate receptor promotes exocytosis in insulin-secreting cells. *Proc.Natl. Acad.Sci.*, **94**: 6232-6237.
- Zhang C., Moriguchi T., Yamamoto M., Takahashi S., *et al.* (2005) MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol.Cell.Biol.*, **25**:4969-4976.
- Zimmet P., Alberti K.G. and Shaw J. (2001) Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, **414**: 782-787.