

Nous horitzons en la història de la diabetis *mellitus*: la recuperació de la cèl·lula beta

Discurs de presentació de Ramon Gomis de Barbarà
com a membre numerari de la Secció de Ciències
Biològiques, llegit el dia 20 de març de 2017



Institut
d'Estudis
Catalans

SECCIÓ
DE CIÈNCIES
BIOLÒGIQUES

Nous horitzons en la història
de la diabetis *mellitus*:
la recuperació
de la cèl·lula beta

Nous horitzons en la història de la diabetis *mellitus*: la recuperació de la cèl·lula beta

Discurs de presentació de Ramon Gomis de Barbarà
com a membre numerari de la Secció de Ciències
Biològiques, llegit el dia 20 de març de 2017

Barcelona, 2017



Institut
d'Estudis
Catalans

SECCIÓ
DE CIÈNCIES
BIOLÒGIQUES

Biblioteca de Catalunya. Dades CIP

Nous horitzons en la història de la diabetis mellitus : la recuperació de la cèl·lula beta : discurs de presentació de Ramon Gomis de Barbarà com a membre numerari de la Secció de Ciències Biològiques, llegit el dia 20 de març de 2017. — Primera edició

Referències bibliogràfiques

ISBN 9788499653495

I. Institut d'Estudis Catalans. Secció de Ciències Biològiques II. Títol

1. Diabetis — Investigació 2. Cèl·lules B — Investigació

616.379-008.64:001.891

612.112:001.891

© Ramon Gomis de Barbarà

© 2017, Institut d'Estudis Catalans, per a aquesta edició

Carrer del Carme, 47. 08001 Barcelona

Primera edició: març del 2017

Text revisat lingüísticament per la Unitat de Correcció del Servei Editorial de l'IEC

Disseny de la coberta: Azcunce | Ventura

Compost per fotocomposició gama, s. l.

Imprès a Service Point FMI, SA

ISBN: 978-84-9965-349-5

Dipòsit Legal: B 5411-2017

Són rigorosament prohibides, sense l'autorització escrita dels titulars del *copyright*, la reproducció total o parcial d'aquesta obra per qualsevol procediment i suport, incloent-hi la reprografia i el tractament informàtic, la distribució d'exemplars mitjançant lloguer o préstec comercial, la inclusió total o parcial en bases de dades i la consulta a través de xarxa telemàtica o d'Internet. Les infraccions d'aquests drets estan sotmeses a les sancions establertes per les lleis.

La medicina té com a objectiu vetllar per la salut de les persones. Sovint, malgrat les mesures per prevenir-la, la malaltia apareix. En tals circumstàncies, els professionals de la medicina fem el possible per guarir el malalt. Més sovint del que voldríem no ho aconseguim i, en aquest cas, el nostre exercici mèdic s'orienta a convertir una malaltia aguda en crònica. És aleshores quan el nostre interès s'orienta a procurar el màxim benestar al malalt, a millorar-li l'esperança de vida durant els anys de cronicitat i a prevenir les complicacions o altres malalties associades.

Durant tot el temps que he exercit de metge clínic he topat amb situacions diverses on el meu saber mèdic ha sigut molt limitat, incapaç de fer front a la malaltia. M'he adonat que els coneixements adquirits eren insuficients, i no només els meus, sinó els de tota la comunitat mèdica. No podia trobar allò que cercava en els llibres perquè no hi era. Ha estat aleshores quan se m'ha fet més viva la necessitat d'aprofundir en el saber per tal d'evitar, de nou, aquest fracàs. Aquesta inquietud és compartida. Molts metges pensem que la recerca biomèdica es l'únic camí que ens pot facilitar una solució de futur, una solució que permeti millorar la salut de les persones i vèncer la malaltia.

Des de l'inici de la meva carrera mèdica, m'he sentit motivat per la recerca. De primer, per la recerca més clínica, de la mà de l'epidemiologia o de la fisiopatologia i, més endavant, vers una recerca més casual, més orientada a la patogènia, amb la idea de conèixer millor els mecanismes moleculars que ens duen a la malaltia. Conèixer-ne l'entrellat fa més fàcil prevenir i curar les infermetats.

Vaig escollir —gairebé sense voler— l'estudi de la diabetis. L'inici de les vocacions mai no és lineal, sinó que respon a decisions complexes. I així, ben aviat, davant les múltiples preguntes que em generava l'atenció a les persones que patien

diabetis, vaig orientar part de la meua activitat mèdica a la recerca, en aspectes diversos, d'aquesta malaltia. He de dir que, amb entusiasme, em vaig identificar amb els objectius de la recerca de transferència, aquella on convergeix el saber dels clínics amb el dels científics bàsics, ja siguin biòlegs moleculars, immunòlegs, genetistes, físics, matemàtics, bioquímics o enginyers. En podríem ampliar la llista. En qualsevol cas, es tractava de fer-se preguntes que fossin properes al patiment del malalt per traslladar-les als científics més bàsics i, a partir de la resposta que ens donessin, trobar una aplicació útil per al benefici del mateix malalt.

Aquesta recerca és molt propera a la frontera del coneixement i es beneficia de la convergència de troballes, ja siguin físiques, químiques, biològiques o matemàtiques, amb les aplicacions tecnològiques corresponents. Compartir no significa oblidar la responsabilitat que el metge té en el procés de la recerca biomèdica. No hi ha recerca biomèdica sense metges i és important no oblidar-ho si volem ser eficients en l'aplicació dels coneixements científics orientats a millorar la salut de les persones.

Enunciant aquestes quatre idees generals, intentaré exposar —de manera més concreta— alguna de les aportacions que, al llarg de trenta-cinc anys de recerca, he dut a terme en l'àmbit de la diabetis. I em centraré en una pregunta que, al meu criteri, és important: quin és el paper de la cèl·lula beta en el desenvolupament de la malaltia diabètica?, és aquest l'esglau clau?; i, si és així, com hi podem intervenir?

En la història de la medicina, altres investigadors del nostre país han fet aportacions importants sobre la diabetis. No deixaré d'esmentar la labor de l'Institut de Fisiologia i els treballs d'August Pi i Sunyer, de Rossend Carrasco i Formiguera i de Pere Domingo, entre d'altres. Som deutors de la tradició, de l'escola, dels nostres mestres. I de tots aquells que, contemporanis a nosaltres i també al nostre país, han estat capaços de trencar paradigmes establerts i dissenyar altres horitzons per a aquesta malaltia. Els tenim ben presents perquè sabem que una bona part de les nostres aportacions són properes a les seves i, fins i tot, n'hem compartit unes quantes.

I anem a la ciència. Tal com he anunciat, m'agradaria respondre a la pregunta que he fet i que repeteixo: és la cèl·lula beta l'esglau clau de la malaltia diabètica?

La diabetis *mellitus* (o diabetis sacarina) és una malaltia prevalent causada per un dèficit total o parcial d'insulina. Aquest dèficit comporta una alteració del metabolisme dels glúcids, dels greixos i de les proteïnes. La característica humoral més destacada de la diabetis és l'augment de les concentracions plasmàtiques de glucosa, la hiperglucèmia. Aquesta variable contínua és el marcador bioquímic que ens permet establir el diagnòstic de la malaltia.

És ben conegut que en la fisiopatologia de la diabetis hi participa la pèrdua de massa cel·lular beta i/o l'alteració funcional d'aquesta cèl·lula pancreàtica, tant pel

que fa a la quantitat com a la qualitat de la secreció d'insulina. Tanmateix, en algunes formes de la malaltia, existeix un grau més gran o més petit de resistència a la insulina que, de manera indirecta, condiciona el fracàs relatiu de la cèl·lula beta pancreàtica. Un augment de la resistència a la insulina dels teixits perifèrics comporta hiperplàsia i hipertròfia de la cèl·lula beta, juntament amb un augment de la disponibilitat en la producció d'insulina que, si no es produeix, porta a la malaltia diabètica. En funció d'aquestes diferències fisiopatològiques s'estableixen diverses formes de diabetis, entre les quals destaquem les anomenades *diabetis de tipus 1* i *diabetis de tipus 2*. El tractament inicial de les dues formes de diabetis és diferent. Mentre que la diabetis de tipus 1 és tributària d'un tractament obligat amb insulina, la diabetis de tipus 2 pot ser tractada, a l'inici, només amb dieta i antidiabètics orals; només en estadis avançats de la malaltia —quan la pèrdua de la massa cel·lular beta ja és molt important— es requereix tractament amb insulina. Qualsevol d'aquests tractaments de la diabetis de tipus 2 —ja siguin antidiabètics orals o insulina— no cura la malaltia, sinó que la converteix en una malaltia crònica, la qual cosa permet, a la persona que la pateix, una supervivència de llarga durada. No obstant això, en diverses fases del procés poden aparèixer complicacions pròpies de la diabetis, ja siguin agudes, com la cetoacidosi i la hipoglucèmia, o cròniques, com les anomenades retinopatia, nefropatia, neuropatia i dermopatia diabètiques.

La recerca actual en diabetis s'orienta, d'una banda, a conèixer millor les causes que la provoquen per tal de trobar-ne una cura i, d'altra banda, a millorar el tractament crònic mitjançant l'obtenció d'un substitut, no tan sols del producte hormonal deficitari (la insulina), sinó també del conjunt cel·lular destruït (la cèl·lula beta); és a dir, mitjançant una millora de la producció d'insulina i del sistema sensor que la regula.

Tenint en compte aquestes consideracions inicials, hem orientat una part important dels projectes de recerca que he dirigit a investigar com es pot recuperar la massa cel·lular beta danyada i, alhora, com es pot recuperar la funció global insulinosecretora, de manera que siguem capaços de normalitzar l'activitat metabòlica de glúcids, greixos i proteïnes. En aquest sentit, al llarg del temps ens hem formulat diverses preguntes.

La primera és la següent: com podem evitar la mort de la cèl·lula beta? Pensem que, per respondre-la, ens cal conèixer algun dels determinants moleculars implicats en aquest procés de mort cel·lular. Si el coneixem, serà més fàcil identificar com aquest determinant provoca la mort cel·lular.

En una primera sèrie de treballs, vam intentar relacionar l'activitat autoimmunitària en la diabetis tipus de 1 amb la disfunció de la cèl·lula beta, entenent que aquesta disfunció podria ser un mirall de la pèrdua de massa cel·lular beta. Per això —en un treball clínic— vam intentar trobar una relació entre el títol d'anti-

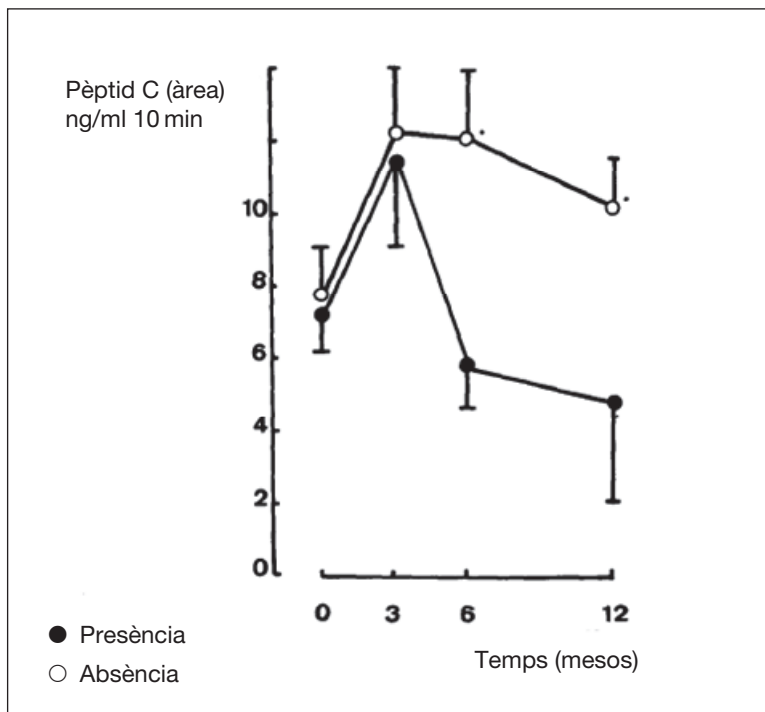


FIGURA 1. Resposta funcional de la cèl·lula beta basada en la presència i l'absència d'anticossos circulants en els malalts de diabetis.

cossos al sèrum dels malalts de diabetis amb el grau de secreció d'insulina o el seu equivalent, el pèptid C, per part de la cèl·lula beta. Els resultats ens van mostrar la relació representada a la figura 1 [1, 2].

En aquesta figura es pot observar com la presència (rodona negra) o absència (rodona blanca) d'anticossos circulants és un indicador de la resposta funcional de la cèl·lula beta, la qual cosa suggereix que la intensitat de l'agressió immunitària condiona la funció de la secreció d'insulina i, en conseqüència, l'estat metabòlic.

Si és així, és raonable pensar que l'activitat autoimmunitària indica el grau de lesió i, indirectament, la pèrdua de massa cel·lular beta. I és ara quan ens podem preguntar si la prescripció d'un tractament immunomodulador pot revertir la situació, és a dir, si aquest tractament és capaç de disminuir el grau d'agressió, millorar la disfunció insulinoscretora i limitar el grau de pèrdua del nombre cèl·lules beta. Per respondre a aquesta pregunta l'estratègia més senzilla és intervenir en aquest tipus de diabetis (de tipus 1) i en les etapes inicials de la malaltia amb substàncies immunodepressores o immunomoduladores, i valorar l'impacte clí-

nic d'aquesta decisió. Hi ha diferents maneres de fer-ho i aquí n'exposarem dues que hem investigat. La primera és l'administració de cortisona en malalts amb diabetis de tipus 1 en el moment del debut clínic de la malaltia amb la intenció de modificar la reactivitat immunitària i obtenir beneficis sobre la funció beta pancreàtica. Es va administrar prednisona a dosis d'1 (mg/kg)/dia durant deu dies i de 0,3 (mg/kg)/dia durant cinquanta dies més. Es van comparar els malalts tractats amb els controls corresponents, del mateix temps d'evolució clínica, edat, pes, títol d'anticossos i funció insulinosecretora en condicions basals i després d'estímul amb glucagó. Vam observar que el tractament immunodepressor disminuïa l'activitat autoimmunitària mesurada pels títols d'anticòs en sèrum i millorava la funció beta pancreàtica, però no tenia cap impacte sobre l'evolució clínica de la malaltia [3]. És possible que aquesta no fos l'estratègia immunodepressora adequada. Sabíem que altres investigadors, utilitzant ciclosporina i azatioprina, obtenien més bons resultats, amb una remissió temporal de la malaltia però sense aplicació clínica possible atès que induïen a una alta toxicitat renal. En aquest cas, teníem un dilema: a més eficiència, més toxicitat; a menys eficiència, menys toxicitat. A partir de tots aquests resultats la immunosupressió convencional va ser abandonada. I, com en altres camps científics, noves descobertes en recerca bàsica van fer reconsiderar algunes de les estratègies clíniques orientades a reduir l'activitat immunitària. Així, gràcies als nous coneixements sobre el poder citotòxic de les citocines, els tractaments es van poder orientar vers altres característiques moleculars.

En el transcurs de la nostra activitat investigadora ens vam interessar per l'impacte de la interleucina 1 beta (IL-1 β) sobre la cèl·lula beta. Es tractava d'analitzar els mecanismes moleculars del seu procés destructiu i de trobar com es podia limitar o inhibir aquest efecte citotòxic. Per això vam realitzar diferents experiments *in vitro* amb illots pancreàtics isolats de rosegadors. Vam incubar els illots amb IL-1 β i vam observar com en aquest procés es trencava el DNA nuclear, s'iniciava la reparació del DNA trencat a través de l'augment de l'activitat de l'enzim poli(ADP-ribose)-sintetasa i s'induïa a un increment del consum del substrat NAD en el procés; aquest consum alterava la síntesi proteica i, per tant, la síntesi d'insulina. Augmentar l'aportació del substrat NAD, a través de l'administració de nicotinàmida, podria suposar algun avantatge. En teoria, en incrementar l'efecte reparador de l'enzim per augment de substrat hauria de millorar la viabilitat de la cèl·lula beta sense afectar la producció d'insulina. I així va ser: els resultats *in vitro* van demostrar que la nicotinàmida mantenia la supervivència de la cèl·lula beta i la funció insulinosecretora enfront de la IL-1 β [4].

Aquests resultats ens van encoratjar a investigar si l'administració de nicotinàmida prevenia la diabetis. Vam iniciar aquest projecte de recerca amb un model experimental animal de diabetis autoimmunitària, la rata Wistar BB. Vam tractar els animals durant nou setmanes amb nicotinàmida i vam comparar l'impacte de

la intervenció enfront d'animals de control. Tal com esperàvem, la nicotinamida disminuïa el nombre de casos amb diabetis en aquesta rata BB, i vam concloure que aquesta substància podia ser un tractament curatiu o preventiu de la diabetis autoimmunitària (diabetis de tipus 1). A partir d'aquests resultats ens van autoritzar a desenvolupar un estudi pilot que consistia a administrar nicotinamida oral a un grup de persones diagnosticades recentment de diabetis de tipus 1. Es van incloure vint malalts en un estudi a doble cec. Al grup tractat amb nicotinamida li vam administrar 1 g al dia d'aquesta substància per via oral i als controls, una substància placebo. Els resultats van demostrar un augment en la secreció d'insulina endògena, fet que vam atribuir a una atenuació del procés d'agressió immunitària, però no vam observar cap impacte en la remissió clínica, ni en el nombre d'unitats d'insulina necessàries per aconseguir els objectius normoglicèmics, ni en el grau de control metabòlic. Podem concloure que, amb les dosis utilitzades, la nicotinamida no és capaç de fer revertir la diabetis de tipus 1 a la normalitat [5]. Anys després, altres autors, amb dosis més elevades, en persones amb alt risc de patir diabetis —prediabetis— i amb més temps d'exposició a la substància, tampoc van aconseguir demostrar un efecte beneficiós de la nicotinamida sobre el curs de la malaltia, més enllà de petits canvis sense significança clínica [6].

Unes observacions ens van canviar la visió del problema. No havíem aconseguit cap avenç de rellevància clínica a través d'estratègies que intentaven inhibir el procés agressiu mediat per l'autoimmunitat. I tampoc no semblava que sabéssim molt bé cap a on calia dirigir els propers projectes. Enmig d'aquests dubtes, els pares d'un nen que va morir de cetoacidosi diabètica, i que feia més de deu anys que patia la malaltia, van autoritzar la donació dels òrgans del pacient per al transplantament clínic i, a més a més, la donació del pàncrees per a l'estudi de l'etiopatogènia de la malaltia. Vam aïllar illots d'aquest pàncrees, és a dir, illots d'un malalt amb diabetis de tipus 1 de més de deu anys d'evolució postdiagnòstic i tractament amb insulina. Aquests illots estaven formats per cèl·lules beta que expressaven insulina i l'alliberaven davant la glucosa [7].

Això ens va fer pensar dues coses. La primera ens va fer suposar que, per algun motiu, per algunes característiques no conegudes, les cèl·lules beta que observàvem eren cèl·lules romanents que havien estat resistents a l'atac autoimmunitari. La segona ens va suggerir que les cèl·lules beta provenien de cèl·lules no-beta a través d'un precursor que no havíem identificat.

A partir de les reflexions que abans he exposat, la pregunta que ens fèiem era la següent: com podríem provocar la replicació de les cèl·lules beta romanents a l'atac destructiu de naturalesa immunitària o com podríem provocar la transdiferenciació per mitjà d'un precursor pancreàtic, fos una cèl·lula del pàncrees no endocrí o una cèl·lula d'un altre origen? Una observació casual posterior em va ajudar a respondre —en part— a aquesta pregunta. Sabíem que alguns autors havien

demostrat que alguns factors de creixement induïen replicació, com la prolactina i els IGF, o afavorien la neogènesi, com l'INGAP ('proteïna associada a la neogènesi insular'). Però teníem ben poca informació sobre possibles substàncies que, administrades per via oral, poguessin afavorir tant un augment de replicació com la diferenciació. Vam observar en rosegadors tractats per via oral amb sals de tungstat de sodi un efecte no conegut sobre l'illot pancreàtic. Aquest efecte s'observava en els animals amb un dèficit de cèl·lula beta i era similar al que s'observa en aquells humans que han estat diagnosticats de diabetis de tipus 1 [8]. Aquesta substància era capaç de normalitzar la glucèmia i augmentar la secreció d'insulina per part dels illots pancreàtics.

Com es produïa? Durant un quant temps hem intentat esbrinar més detalls d'aquest efecte de les sals del tungstat sòdic sobre l'illot pancreàtic en la diabetis secundària amb una reducció de massa cel·lular beta. En un primer grup d'experiments vam utilitzar un model de rata diabètica amb reducció parcial de massa cel·lular beta, la rata nSTZ ('estreptozotocina neonatal'). Es tracta d'un model de diabetis induïda per estreptozotocina (STZ), tòxic específic de cèl·lula beta administrat al cap de tres o quatre dies del naixement. En aquestes condicions, quan la rata esdevé adulta —nou setmanes de vida—, presenta una diabetis amb glucèmies basals al voltant de 200 mg/dl, molt similars a les que s'observen en la diabetis *mellitus* de tipus 2 dels humans. En l'anàlisi morfològica es visualitza una reducció del 70 % de la massa beta pancreàtica. Administrant 2 mg/ml en l'aigua de beguda d'aquests animals durant quatre setmanes, s'aconseguia gairebé la recuperació total de la massa cel·lular beta perduda i, en suprimir el tractament, les rates tractades mantienien la normoglicèmia, la qual cosa suggeria que no només havíem controlat la disfunció glucèmica, sinó que també havíem aconseguit guarir els animals.

A la figura 2 s'observa, a dalt, que l'administració oral de tungstat sòdic normalitza la glucèmia dels animals diabètics (els quadrats negres respecte als blancs; les rodones representen els controls no diabètics) i, a baix, que algunes cèl·lules d'origen exocrí o estructural expressen insulina —en verd—, cosa que suggereix neogènesi.

Si observem la figura veurem que no només es produeix un augment en la proliferació, sinó que també es detecta un augment en el grau de transdiferenciació de cèl·lules del ducte en cèl·lules que expressen insulina. Tot aquest procés està regulat per un augment en la fosforilació del factor promotor de la insulina —PDX-1— amb translocació intracel·lular d'aquest pèptid, i el consegüent augment de proliferació, diferenciació i síntesi d'insulina [9].

Ens trobàvem davant d'una observació interessant. L'administració oral d'una sal de tungstat era capaç de revertir el fenotip diabètic i, el que era més avantatjós, en suprimir el tractament aconseguíem que la normoglicèmia es mantingués estable. Malauradament, la dosi efectiva de tungstat sòdic va resultar ina-

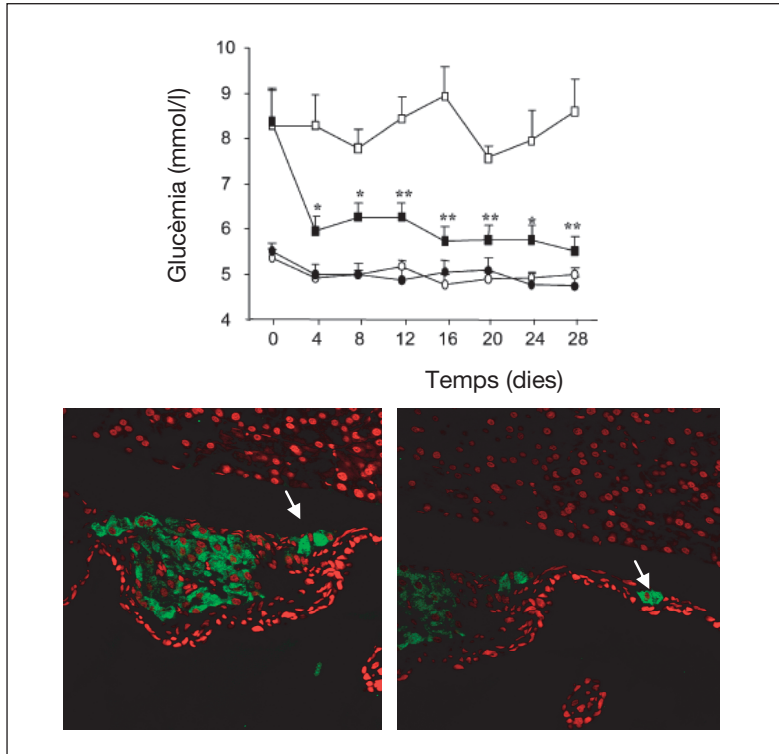


FIGURA 2. Normalització de la glucèmia en animals diabètics i no diabètics després de l'administració de tungstat sòdic. A sota, insulina en cèl·lules d'origen exocrí o estructural.

dequada per als humans. Els estudis de toxicitat no ens permetien l'aplicació d'aquesta molècula al tractament de la diabetis.

A partir d'aquí, se'ns plantejava una altra pregunta: quin era el mecanisme de curació experimental i quines dianes específiques aconseguien la recuperació total de la massa cel·lular beta? Per contestar-la calia identificar el mecanisme molecular i, per descomptat, avaluar si a través de les dianes crítiques detectades podríem trobar altres possibles agents terapèutics que tinguessin un efecte similar al tungstat sòdic però sense la toxicitat.

Per aquest motiu vam iniciar una sèrie d'experiments amb el model de rata diabètica induïda amb una dosi única d'estreptozotocina en l'edat adulta. Aquest model es caracteritza per presentar un fenotip amb hiperglucèmia elevada, insulino-pènia marcada i massa cel·lular beta mínima. Vam tractar els animals diabètics amb tungstat sòdic per via oral amb les dosis ja assenyalades i vam observar que al

cap de cinc setmanes de tractament la recuperació de la massa cel·lular beta era gairebé total, amb valors de glucèmia gairebé normals i una marcada recuperació de la insulinèmia. Es reproduïa en aquest model el mateix que ja havíem observat en altres models experimentals de diabetis. El tungstat sòdic revertia la diabetis en incrementar la taxa de replicació de la massa cel·lular beta, a partir de les cèl·lules romanents de l'atac químic amb STZ. Vam obtenir illots pancreàtics dels diferents grups: animals de control, animals de control tractats amb tungstat sòdic, animals amb diabetis i animals amb diabetis tractats també amb la sal de tungstat. Un cop isolades les cèl·lules, a través de diferents matrius d'expressió gènica, vam identificar el gens dels illots que es modificaven amb el tractament. Després de la consegüent anàlisi bioinformàtica vam poder concloure que l'administració de tungstat sòdic a animals diabètics activa la proteïna-cinasa activada per mitògens (MAPK), incrementa la fosforilació de p42/p44 i indirectament disminueix l'expressió de la proteïna-cinasa Raf inhibidora (RKIP). A partir d'aquesta primera observació vam poder definir les vies activades pel tungstat sòdic en el procés de replicació i els corresponents nodes crítics [10].

Si volíem mirar una mica més lluny, podíem investigar si generant un animal modificat genèticament que expressés una reducció de RKIP s'observava una resistència a presentar diabetis després de l'administració de STZ o, encara millor, una recuperació de la massa cel·lular després de l'agressió química. I, com esperàvem, el ratolí *knockout* (RKIP^{-/-}), després de perdre una bona part de la pròpia massa cel·lular a causa de la STZ, era capaç —espontàniament— de recuperar-la i aconseguir la normoglicèmia [11].

Tanmateix, calien altres evidències. Per aquest motiu vam administrar tungstat sòdic a un altre model animal que es caracteritza per la pèrdua progressiva de cèl·lula beta i que desenvolupa diabetis. Es tracta del *knockout* de la proteïna substrat de la insulina, l'anomenada IRS-2. Aquest ratolins (IRS-2^{-/-}) tenien «noquejada» aquesta proteïna en les cèl·lules de l'illot i, tan bon punt vam observar que presentaven hiperglucèmia, els vam tractar amb tungstat sòdic oral a les dosis ja utilitzades. L'objectiu era observar si recuperaven la normoglicèmia i, alhora, evitàvem la progressió a una diabetis insulinodepenent. Els resultats confirmaven la nostra hipòtesi de treball. El tungstat sòdic revertia la hiperglucèmia i evitava l'aparició de diabetis, a través d'una recuperació de la massa cel·lular beta perduda. El mecanisme molecular d'aquesta recuperació era l'augment de la fosforilació que la mateixa insulina genera sobre la cascada de senyals provocada per l'activació del receptor d'insulina a la cèl·lula beta. Aquesta segona evidència reforça la idea que la regeneració de la massa cel·lular beta és possible [12].

No obstant això, un dels riscos d'activar la replicació de la cèl·lula beta és la possibilitat d'induir una replicació desordenada que ens condueixi a la formació de tumors. Per aquest motiu ens hem preguntat sovint si no existeixen algunes vies

fisiològiques reguladores de la replicació que, malgrat que són menys potents, siguin més útils a l'hora de fer aplicacions terapèutiques. Per aquest motiu, vam intentar esbrinar en quins moments de la biologia humana tenim evidències d'una adaptació de la massa cel·lular beta a l'augment de les necessitats d'insulina. En vam identificar tres. El primer és durant el període de lactància, quan l'infant adapta la plasticitat cel·lular beta a l'augment de la demanda d'insulina per tal d'utilitzar els substrats metabòlics que li arriben a través de la nutrició oral. El segon és durant la gestació, quan la mare augmenta la necessitat de produir hormones anabòliques, com la insulina, per tal d'afavorir el creixement del fetus. I el tercer és quan s'incrementa la ingesta i es produeix un sobrepès, com un intent fisiològic de treure profit dels substrats energètics en temps d'abundància.

A partir d'aquests coneixements previs, ens vam fer les preguntes següents: hi ha factors secretats pel teixit gras peripancreàtic que modulin la plasticitat pancreàtica i, en especial, la població de cèl·lules beta?; si és així, quins són aquests factors? Per respondre a aquestes noves preguntes vam utilitzar el model de rata obesa induïda per dieta de cafeteria. En aquest model vam estudiar la morfometria del pàncrees i vam observar com aquests animals, en engreixar-se, augmenten la població de cèl·lules beta amb relació als controls, amb un increment de la taxa de replicació. Vam pensar que, com a mínim en aquest model, aquest procés podria estar regulat per algunes de les citocines que segrega el teixit gras blanc i, en concret, el teixit gras blanc peripancreàtic (secreció paracrina). Per tal de demostrar-ho, vam obtenir el producte de secreció de diferents bocins de teixit gras blanc del voltant del pàncrees i vam observar que aquest producte induïa una replicació més gran de cèl·lules beta amb relació al que alliberava el teixit gras blanc del grup control. Mitjançant anàlisis d'expressió proteica diferencial vam poder establir quines proteïnes senyal participaven en aquesta regulació. Entre les identificades, podem destacar la proteïna transportadora del factor de creixement IGF, l'anomenada IGFBP-3, i una de les anomenades proteïnes arrissades que modifiquen els senyals de Wnt, la proteïna SFRP5. Ambdues, IGFBP-3 i SFRP5, tenen un paper rellevant en el procés de regulació plàstica [13, 14].

El pas següent era esbrinar si la modificació de l'expressió gènica d'aquestes proteïnes a les cèl·lules de l'illot era capaç de variar el procés de replicació d'aquestes cèl·lules, en el sentit que la modificació en l'expressió mimetitzava els efectes sobre la plasticitat que hem observat en el model d'obesitat. Aquestes hipòtesis es van confirmar. La modificació tant d'IGFBP-3 com de SFRP5 altera el nombre de cèl·lules beta funcionals a l'illot [13, 14].

No obstant això, no ens podem explicar aquesta interrelació entre teixits d'una manera unidireccional, sinó que n'hem de fer un tractament més sistèmic, entenent que si bé existeixen uns nusos crítics —possibles dianes terapèutiques—, aquests es relacionen. Intervenir en un d'aquests nusos pot, en alguns casos, mo-

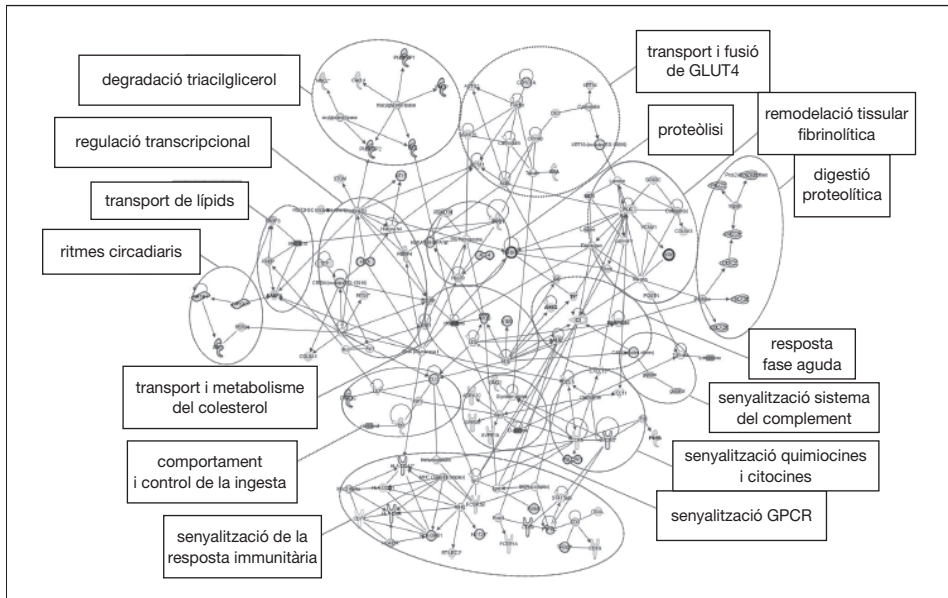


FIGURA 3. Anàlisi de la interrelació dels nusos crítics del teixit gras blanc peripancreàtic.

dificar la funcionalitat d'un altre, mitjançant contrapesos i mecanismes de compensació. Per això vam fer un tractament diferent. Vam obtenir teixit adipós peripancreàtic i illots d'aquest model de rata obesa i no tan sols vam fer una anàlisi de l'expressió gènica dels teixits, sinó també del mateix proteasoma així com del metaboloma secretat.

L'anàlisi del conjunt resultant, elaborada mitjançant eines bioinformàtiques, es mostra a la figura 3. Amb aquesta anàlisi vam poder identificar —amb més precisió— les molècules crítics en el procés de regulació de la plasticitat de l'illot i les interrelacions entre les diferents vies. En conseqüència, ens va obrir nous camins de recerca en la interrelació entre teixits, en concret entre teixit gras blanc i cèl·lula beta. Qualsevol aposta de futur —i altres grups treballen en aquesta idea— exigeix l'anàlisi simultània de més teixits que ens permetria no només identificar els nusos crítics, sinó també les vies metabòliques bàsiques implicades en els processos de regulació plàstica i funcional de la cèl·lula beta [15].

Amb els resultats mostrats es pot suggerir que, en un futur, la inducció de replicació podria ser una bona estratègia per curar la diabetis amb dèficit d'insulina. Malgrat tot, si partim d'una població residual petita, l'efecte inductor pot ser insuficient, en especial si, com està descrit, la pèrdua de massa cel·lular beta és superior al 80 % i la massa residual amb capacitat de replicar és molt petita, tal com succe-

eix en la diabetis de tipus 1. Una manera adequada de superar aquesta limitació seria tractar la diabetis en les fases inicials, fins i tot abans del diagnòstic clínic de la malaltia (prediabetis), quan només existeix intolerància a la glucosa i anticossos circulants d'autoimmunitat (anti-GAD, anti-IA2, anti-IAA, anti-pZn, entre d'altres). Una altra opció seria activar aquest procés de replicació posttrasplantament d'illots o cèl·lules beta, de manera que els empelts cel·lulars, insuficients en nombre de cèl·lules, es poguessin autoreplicar i milloressin en eficiència en assolir la normoglicèmia.

Hem explorat aquesta darrera opció. Fa uns quants anys vam desenvolupar l'aïllament d'illots pancreàtics humans a partir de donants de cadàver, amb la idea de ser capaços de poder tractar les persones que patien diabetis de tipus 1 amb el trasplantament d'illots. Treballs experimentals previs ens van ensenyar que la xarxa de vasos sanguinis que nodreix l'empelt d'illots és clau per a l'èxit del trasplantament [16].

Quan vam iniciar el programa clínic amb humans vam observar que els beneficis del trasplantament eren limitats en el temps. Encara que incrementàvem la secreció d'insulina endògena i disminuïem de manera ben marcada l'administració d'insulina exògena, al cap d'uns quants mesos de la intervenció l'estat metabòlic del pacient era ben similar al que observàvem abans del trasplantament. Una reanàlisi de les dades i dels estudis d'altres autors suggereixen que la manca d'una xarxa microvascular adequada pot ser crítica per a la supervivència de l'illot. Pensem que el fracàs, a mitjà o a llarg termini, del trasplantament cel·lular aplicat al tractament de la diabetis en humans podria estar relacionat —en part— amb la manca d'una xarxa microvascular adequada.

No cal dir que un fracàs —encara que sigui parcial— sempre et porta a modificar el camí. A partir d'aquesta reflexió ens vam adonar que durant els treballs previs, quan estudiàvem els efectes beneficiosos del tungstat sòdic sobre la cèl·lula beta, en el procés de replicació també s'estimulava l'augment de la xarxa vascular i que aquest augment estava regulat per la inhibició d'una fosfatasa, la PTP1B.

Què succeiria si trasplantàvem illots amb una inhibició de PTP1B? Per con- testar la pregunta vam dissenyar un estudi utilitzant illots pancreàtics procedents d'un animal *knockout* per PTP1B. Vam trasplantar aquests illots PTP1B^{-/-} a ratolins diabètics. Com a controls, vam utilitzar illots no «noquejats» per PTP1B —illots PTP1B^{+/+}—, que també vam trasplantar a animals diabètics. Tots els trasplanta- ments els vam fer a la cambra anterior de l'ull, de manera que, gràcies a un micros- copi confocal, era fàcil fer un seguiment de la viabilitat cel·lular de l'empelt i la xarxa microvascular.

Els resultats obtinguts ens confirmen que PTP1B^{-/-} incrementa la revascularit- zació i millora la supervivència i la funcionalitat de l'empelt, tal com s'aprecia a la figura 4 (en vermell, la xarxa microvascular). A partir d'aquesta observació hem

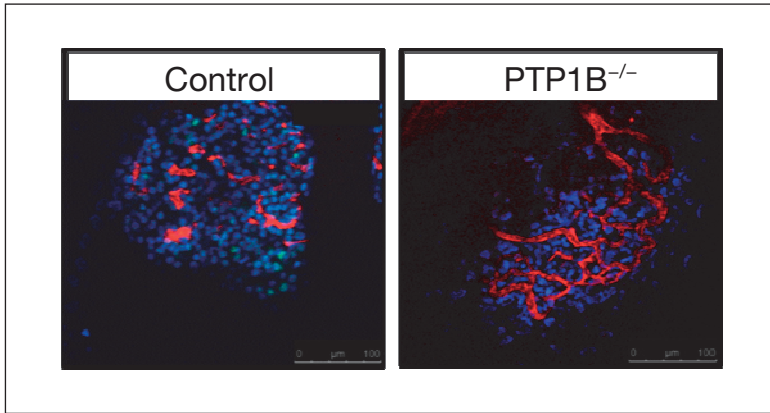


FIGURA 4. Illot no «noquejat» per PTP1B (esquerra) i illot PTP1B^{-/-} (dreta) trasplantats a la cambra anterior de l'ull de dos ratolins diabètics.

analitzat quins són els mecanismes pels quals la inhibició o manca d'expressió de PTP1B augmenta la vascularització. Sabem que aquest efecte és mediat per un increment regulat de VEGF-1, sense que en cap cas aquest augment de cèl·lules endotelials disminueixi el nombre de cèl·lules beta; ben al contrari, les incrementa. Tanmateix, si «noquejàvem» PTP1B en illots humans observàvem resultats similars pel que fa a l'increment de revascularització i supervivència [17].

Hem avançat en el coneixement però se'ns presenten dos problemes si volem aconseguir una intervenció terapèutica adequada:

- 1) Necessitem un nombre de cèl·lules beta suficient perquè un trasplantament amb finalitats terapèutiques sigui eficient. Com ho podem aconseguir?
- 2) Necessitem que aquestes cèl·lules siguin compatibles amb el receptor per tal d'evitar tractar el receptor amb immunosupressors. Com ho podem aconseguir?

A més, cal tenir en compte el següent:

a) En el cas que aconseguíssim cèl·lules beta, hauríem d'aïllar aquestes cèl·lules de manera que no poguessin patir una agressió autoimmunitària, atès que en el cas de la diabetis de tipus 1 estem parlant d'una malaltia on la autoimmunitat té un paper patogènic. Com la podríem evitar?

b) Si aconseguíssim un nombre suficient de cèl·lules compatibles i les protegíssim adequadament, ens caldria portar a terme una revascularització adequada.

Per tal de respondre a aquestes preguntes hem obtingut cèl·lules beta diferenciades a través de cultius de fibroblasts. Aquests cultius els hem obtingut a partir d'una mostra de teixit subcutani de la pell de voluntaris, malalts de diabetis o no.

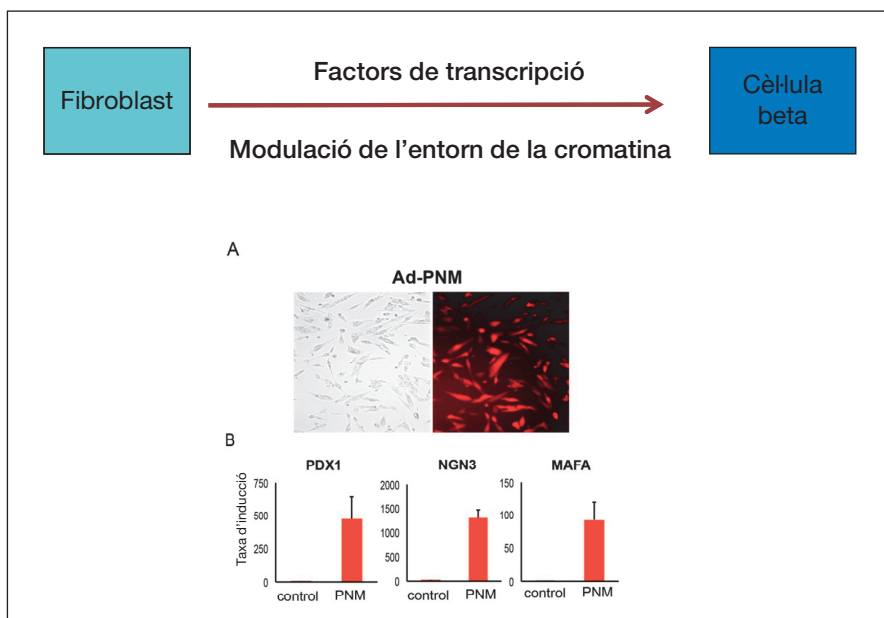


FIGURA 5. Cèl·lules beta obtingudes a partir de cultius de fibroblasts.

Pel que fa a l'expressió gènica, aquestes cèl·lules beta són idèntiques a les de l'individu que ens les ha proporcionades (figura 5). Per tant, ja hem avançat en aquest sentit. Ens queda millorar l'eficiència funcional d'aquestes cèl·lules beta obtingudes ja que, si bé segreguen insulina, aquesta secreció regulada és menys eficient que la que obtindriem de cèl·lules beta de l'illot pancreàtic.

Tenim cèl·lules idèntiques. Cal que en millorem la funcionalitat i les protegem de l'atac autoimmunitari. Per això amb altres grups estem desenvolupant una mena de bastida, una estructura en forma de malla que ens ha de permetre incorporar-hi les cèl·lules beta obtingudes, aconseguir-ne la revascularització —silenciarem la PTP1B— així com una funcionalitat adequada.

Aquestes darreres preguntes només tenen respostes inicials, no definitives, i hi ha camp per córrer.

La visió aquí exposada és una de les possibles sobre la recerca de la funcionalitat i plasticitat de la cèl·lula beta. N'hi ha d'altres, i algunes són tant o més prometedores. Tot l'argumentari es basa en la idea que la cèl·lula beta és la màxima responsable del fracàs metabòlic de la diabetis. Però, i si la diabetis no fos una malaltia de l'illot pancreàtic? I si fos una malaltia neuronal, com ja apuntava Claude Bernard? O hepàtica? O hi hagués tantes formes de diabetis a causa d'una etiopatogènia encara més diversa? L'any 1922, a l'Institut de Fisiologia de Barcelona, l'equip

que dirigia August Pi i Sunyer va obtenir insulina d'extractes pancreàtics de bous, i això va permetre aplicar la insulina en el tractament de la diabetis de tipus 1 a malalts que, si no haguessin tingut l'opció d'aquest tractament, haurien mort. Més endavant, diferents investigadors del nostre país han fet aportacions de gran rellevància en l'estudi de la diabetis, i ens han apropat a una millor prevenció i tractament de la malaltia i de les seves complicacions. En la recerca biomèdica els camins són múltiples però tots pretenen, com a objectiu final, aconseguir el benestar del malalt i, en la mesura que sigui possible, deslliurar-lo de la malaltia. Només a través de la recerca serà factible —en un futur— aconseguir aquest darrer objectiu.

REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

- [1] GOMIS, R.; RECASENS, A.; PEIG, M.; CASAMITJANA, R.; PUJOL-BORRELL, R.; RIVERA, F.; VILARDELL, E. (1988). «Presence of insulin autoantibodies at clinical diagnosis of diabetes mellitus type I predicts loss of beta cell function». *Autoimmunity*, vol. 1, núm. 4, p. 299-305.
- [2] PEIG, M.; GOMIS, R.; ERCILLA, G.; CASAMITJANA, R.; BOTTAZZO, G. F.; PUJOL-BORRELL, R. (1989). «Correlation between residual beta-cell function and islet cell antibodies in newly diagnosed type I diabetes. Follow-up study». *Diabetes*, vol. 38, núm. 11, p. 1396-1401.
- [3] GODAY, A.; PUJOL-BORRELL, R.; FERNÁNDEZ, J.; CASAMITJANA, R.; RÍOS, M.; VILARDELL, E.; GOMIS, R. (1993). «Effects of a short prednisone regime at clinical onset of type 1 diabetes». *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 20, núm. 1, p. 39-46.
- [4] FERNÁNDEZ-ALVAREZ, J.; TOMÁS, C.; CASAMITJANA, R.; GOMIS, R. (1994). «Nuclear response of pancreatic islets to interleukin-1 beta». *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 103, núm. 1-2, p. 49-55.
- [5] MENDOLA, G.; CASAMITJANA, R.; GOMIS, R. (1989). «Effect of nicotinamide therapy upon B-cell function in newly diagnosed type 1 (insulin-dependent) diabetic patients». *Diabetologia*, vol. 32, núm. 3, p. 160-162.
- [6] GALE, E. A.; BINGLEY, P. J.; EMMETT, C. L.; COLLIER, T.; ENDIT GROUP (2004). «European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT) a randomized controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes». *Lancet*, vol. 363, p. 925-931.
- [7] CONGET, I.; FERNÁNDEZ-ALVAREZ, J.; FERRER, J.; SARRI, Y.; NOVIALS, A.; SOMOZA, N.; PUJOL-BORRELL, R.; CASAMITJANA, R.; GOMIS, R. (1993) «Human pancreatic islet function at the onset of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus». *Diabetologia*, vol. 36, núm. 4, p. 358-360.
- [8] BARBERÀ, A.; FERNÁNDEZ-ALVAREZ, J.; TRUC, A.; GOMIS, R.; GUINOVAR, J. J. (1997). «Effects of tungstate in neonatally streptozotocin-induced diabetic rats: mechanism leading to normalization of glycaemia». *Diabetologia*, vol. 40, núm. 2, p. 143-149.
- [9] PIQUER, S.; BARCELÓ-BATLLORI, S.; JULIÀ, M.; MARZO, N.; NADAL, B.; GUINOVAR, J. J.; GOMIS, R. (2007). «Phosphorylation events implicating p38 and PI3K mediate tungstate-effects in MIN6 beta cells». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 358, núm. 2, p. 385-391.
- [10] ALTIRRIBA, J.; BARBERÀ, A.; DEL ZOTTO, H.; NADAL, B.; PIQUER, S.; SÁNCHEZ-PLA, A.; GAGLIARDINO, J. J.; GOMIS, R. (2009). «Molecular mechanisms of tungstate-induced pancreatic plasticity: a transcriptomic approach». *BMC Genomics*, vol. 10, p. 406.
- [11] PARDO, F. N.; ALTIRRIBA, J.; PRADAS-JUNI, M.; GARCÍA, A.; AHLGREN, U.; BARBERÀ, A.; SLEBE, J. C.; YÁÑEZ, A. J.; GOMIS, R.; GASA, R. (2012). «The role of Raf-1 kinase inhibitor protein in the regulation of pancreatic beta cell proliferation in mice». *Diabetologia*, vol. 55, núm. 12, p. 3331-3340.
- [12] OLIVEIRA, J. M.; REBUFFAT S. A.; GASA, R.; BURKS, D. J.; GARCÍA, A.; KALKO, S. G.; ZAFRA, D.; GUINOVAR, J. J.; GOMIS, R. (2014). «Tungstate promotes β -cell survival

- in *Irs2*^{-/-} mice». *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*, vol. 306, núm. 1, p. E36-E47.
- [13] PALAU, N.; REBUFFAT, S. A.; ALTIRRIBA, J.; PIQUER, S.; HANZU, F. A.; GOMIS, R.; BARBERÀ, A. (2012). «Role of IGFBP-3 in the regulation of β -cell mass during obesity: adipose tissue/ β -cell cross talk». *Endocrinology*, vol. 153, núm. 1, p. 177-187.
- [14] REBUFFAT, S. A.; OLIVEIRA, J. M.; ALTIRRIBA, J.; PALAU, N.; GARCÍA, A.; ESTEBAN, Y.; NADAL, B.; GOMIS, R. (2013). «Downregulation of Sfrp5 promotes beta cell proliferation during obesity in the rat». *Diabetologia*, vol. 56, núm. 11, p. 2446-2455.
- [15] MALPIQUE, R.; FIGUEIREDO, H.; ESTEBAN, Y.; REBUFFAT, S. A.; HANZU, F. A.; VINAIXA, M.; YANES, O.; CORREIG, X.; BARCELÓ-BATLLORI, S.; GASA, R.; KALKO, S.; GOMIS, R. (2014). «Integrative analysis reveals novel pathways mediating the interaction between adipose tissue and pancreatic islets in obesity in rats». *Diabetologia*, vol. 57, núm. 6, p. 1219-1231.
- [16] MENDOLA, J. F.; CONGET, I.; MANZANARES, J. M.; COROMINOLA, H.; VIÑAS, O.; BARCELO, J.; GOMIS, R. (1997). «Follow-up study of the revascularization process of purified rat islet beta-cell grafts». *Cell Transplantation*, vol. 6, núm. 6, p. 603-612.
- [17] FIGUEIREDO, H.; GARCÍA, A.; FERNÁNDEZ, R.; FARGHALY, H. S.; GOMIS, R.; MALPIQUE, R. (2013). «PTP1B a key player in the improvement of survival of transplanted islet grafts». *Diabetologia*, vol. 56, núm. 1, p. S73-S74.

