



DEPARTAMENT DE BIOLOGIA
CEL·LULAR, FISIOLOGIA I
IMMUNOLOGIA

FACULTAT DE BIOCÈNCIES
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Memòria presentada per
Lorena Usero Redrejo

Per poder optar al grau de
Doctora en Immunologia

Títol de la Tesi Doctoral

Estudi de la funció supressora de la cèl·lules iNKT en el control de la resposta autoimmunitària a la Diabetis Tipus 1 humana

Tesis realitzada al laboratori d'Immunologia Cel·lular de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona sota la direcció de la Dra. Carme Roura Mir

Doctoranda

Directora

LORENA USERO REDREJO

Dra. CARME ROURA MIR

Bellaterra, desembre del 2015



“Sólo aquellos que se atreven a tener grandes fracasos terminan consiguiendo grandes éxitos”

Robert F. Kennedy

“Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo”

Albert Einstein



Abreviacions

TNF α : Tumor necrosis Factor

IFN γ : Interferón

TGF β : Transforming Growth Factor β

Foxp3: Forkhead box protein 3

T1D: Type 1 Diabetes

RRMS: Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis

EAE: Encefalomièlitis autoimmunitària experimental

PPY: Polipèptid pancreàtic

PNLIP: Lipasa pancreàtica

INS: Insulina

HPRT: Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase

NOD: Non-Obese Diabetic

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

α GalCer: alpha-Galactosilceramida

l'iGb3: Isoglobotrihexosilceramida

β GlcCer: β -glucosilceramida

PHA: Fitohemaglutinina

TRAS: Antígens restringits a teixits perifèrics

ICA: Autoanticossos de les cèl·lules dels illots pancreàtics (Islet Cell Autoantibody)

IAA: Anticossos anti-Insulina

APC: Cèl·lules presentadores d'antígens

PBMC: Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica

TCR: Receptor de cèl·lules T

MHC: Complex d'histocompatibilitat principal

Tef: Cèl·lules T efectores

iNKT: Cèl·lules T invariants Natural Killer

Treg: Cèl·lules T reguladores

TT: Teixit Total

ILL: Illots pancreàtics

M: Melsa

IPLs: Limfòcits intrapancreàtics

DCs: Cèl·lules Dendrítiques

SNC: Sistema Nerviós Central

CSF: Líquid Cefaloraquídi

IEDSS: Expanded Disability Status Scale

Índex

Abreviacions

| | |
|---|----------|
| Resum | 1 |
| Abstract (Menció Europea)..... | 3 |
| Introducció..... | 5 |
| I.1 Autoimmunitat..... | 7 |
| I.1.1 Tolerància Central..... | 7 |
| I.1.1 Tolerància Perifèrica..... | 7 |
| I.2 Diabetis Tipus 1 (T1D)..... | 9 |
| I.2.1 Epidemiologia..... | 9 |
| I.2.2 Etiologia..... | 9 |
| I.2.2.1 Factors genètics..... | 9 |
| I.2.2.2 Factors ambientals..... | 10 |
| I.2.2 Òrgan diana de la T1D El pàncrees..... | 11 |
| I.3 Desenvolupament de la T1D..... | 13 |
| I.3.1 Model animal de T1D: Ratolí NOD..... | 13 |
| I.3.1.1 Fases del desenvolupament de la T1D a Ratolins NOD..... | 13 |
| 1) Ratolins NOD pre-T1D: 2-4 Setmanes..... | 13 |
| 2) Ratolins NOD al debut de la T1D: 8-14 setmanes..... | 14 |
| 3) Ratolins NOD diabètics: >20 setmanes..... | 14 |
| I.3.1.2 Fases del desenvolupament de la T1D a humans..... | 15 |
| 1) Individus pre-diabètics..... | 15 |
| 2) Individus al debut de la malaltia..... | 15 |
| 3) Fase “Honeymoon”..... | 15 |
| 4) Individus Diabètics..... | 16 |
| I.4. Immunopatogènesi de la T1D..... | 17 |
| I.4.1 Autoimmunitat contra les cèl·lules β | 17 |
| I.4.1.1 Component cel·lular..... | 17 |
| I.4.1.2 Autoantígens..... | 17 |
| I.4.1.3 Resposta Humoral: Autoanticossos..... | 18 |
| I.5 Cèl·lules iNKT..... | 18 |
| I.5.1 Restricció per CD1..... | 18 |
| I.5.2 Tipus d’antígens reconeguts..... | 19 |
| 1) Antígens endògens i/o propi..... | 19 |
| 2) Antígens lipídics no propis..... | 20 |

| | |
|--|-----------|
| I.5.3 Fenotip..... | 21 |
| a) Grup 1 | |
| b) Grup 2 | |
| b.1) Cèl·lules invariants, semi-invariants o clàssiques | |
| b.2) Cèl·lules iNKT amb TCR divers | |
| I.5.4 Origen i desenvolupament..... | 23 |
| I.5.5 Homeòstasi..... | 23 |
| I.5.6 Cèl·lules iNKT i autoimmunitat..... | 25-26 |
| I.5.6.1 iNKT i T1D | |
| I.6 Cèl·lules Treg | 27 |
| I.6.1 Fenotip..... | 27 |
| a) Cèl·lules T reguladores naturals (nTregs) | |
| b) Cèl·lules T reguladores induïdes (iTregs) | |
| b.1) Les iTregs Tr1 | |
| b.2) Les iTregs Tn3 | |
| I.6.2 Origen i desenvolupament..... | 28 |
| I.6.3 Homeòstasi..... | 30 |
| I.6.4 Cèl·lules Treg i autoimmunitat..... | 31 |
| I.6.4.1 Treg i T1D | |
| I.7 Citocines immunoreguladores..... | 32-33 |
| I.8 Immunoteràpia..... | 34-35 |
| I.8.1 Cèl·lules iNKT | |
| I.8.2 Cèl·lules Treg | |
| Hipòtesi i Objectius..... | 37 |
| Materials & Mètodes..... | 41 |
| M&M.1 Mostres..... | 41 |
| 1.1 Mostres de teixit pancreàtic | |
| 1.1.1 Mostres humanes | |
| 1.1.2 Mostres de teixit pancreàtic de ratolins NOD | |
| 1.2 Seccions de Sang Perifèrica | |
| M&M.2 Tècniques moleculars..... | 44 |
| 2.1 Extracció DNA genòmic | |
| 2.2 Extracció de l'RNA i mesura de la seva integritat | |
| 2.2.1 Extracció d'RNA | |
| 2.2.2 Retrotranscripció: Síntesi de Cdna | |
| 2.3 Reacció en cadena de la Polimerasa (PCR) | |
| 2.3.1 Determinació dels paràmetres de T ^a , MgCl ₂ | |
| 2.4 PCR quantitativa (qPCR) | |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.4.1 | Quantificació de l'expressió de CD3 γ i GAPDH | |
| 2.4.2 | Quantificació de l'expressió del TCR V α 24J α 18 | |
| 2.4.2.1 | Quantificació cèl·lules iNKT | |
| 2.4.3 | Quantificació de l'expressió de Foxp3 | |
| 2.4.3.1 | Quantificació de les cèl·lules Treg. | |
| 2.5 | PCR Convencional..... | 49 |
| 2.5.1 | Amplificació de HPRT, Insulina, PPY i PNLIP | |
| 2.5.1.1 | Quantificació HPRT, Insulina, PPY i PNLIP | |
| 2.5.2 | Amplificació de V α 24J α 18 | |
| 2.5.2.1 | Quantificació de cèl·lules iNKT | |
| 2.5.3 | Amplificació de Foxp3 | |
| 2.5.3.1 | Quantificació de cèl·lules Treg | |
| 2.5.4 | Amplificació de IL-13, IL-13R α 1 i IL-13R α 2 | |
| 2.5.4.1 | Quantificació d'IL-13, IL-13R α 1 i R α 2 | |
| 2.6 | Anàlisi del producte de PCR en gel d'agarosa..... | 53 |
| 2.7 | Seqüenciació..... | 53 |
| M&M.3 | Processament de les mostres de Sang Perifèrica..... | 54 |
| 3.1 | Obtenció de limfòcits de sang perifèrica o PBLs | |
| 3.1.1 | Obtenció de cèl·lules Treg | |
| 3.1.2 | Obtenció de cèl·lules iNKT | |
| M&M.4 | Cultius cel·lulars..... | 56 |
| 4.1 | Expansió <i>in vitro</i> de cèl·lules Treg i de cèl·lules iNKT | |
| 4.2 | Expansió <i>in vitro</i> amb anàlegs de l' α GalCer | |
| M&M.5 | Protocols de tinció..... | 57 |
| 5.1 | Seccions de criòstat | |
| 5.2 | Tincions d'immunofluorescència sobre seccions de teixit | |
| 5.3 | Tincions de cèl·lules iNKT, Treg i Tef | |
| 5.4 | Tinció citoplasmàtica: Detecció de citocines | |
| M&M.6 | Elisa..... | 60 |
| 6.1 | Elisa de TNF α | |
| 6.2 | Elisa d'IL-13 | |

| | |
|---|---------|
| M&M.7 Assajos de supressió..... | 61 |
| 7.1 Assaig de supressió <i>in vitro</i> | |
| 7.2 Assaig de supressió <i>in vitro</i> iNKT:Treg | |
| 7.3 Addició de rh-IL13 i/o anticòs neutralitzant de la funció d'IL-13 en assajos de supressió <i>in vitro</i> . | |
| 7.4 Cultius Transwells | |
| 7.5 Cytometric Bead Array (CBA) | |
| Resultats i discussions..... | 67-179 |
| Capítol (C.1)..... | 67-106 |
| 1) Background | |
| 2) Resultats | |
| 3) Discussió | |
| Capítol (C.2)..... | 107-132 |
| 1) Background | |
| 2) Resultats | |
| 3) Discussió | |
| Capítol (C.3) | 134-171 |
| 1) Background | |
| 2) Resultats | |
| 3) Discussió | |
| Discussió General..... | 172-177 |
| Conclusions..... | 178 |
| Conclusions (Menció Europea) | 182 |
| Annex I..... | 186-211 |
| Bibliografia..... | 212 |
| Publicacions..... | 234 |
| Agraïments..... | 236 |

RESUM

La Diabetis tipus 1 (T1D) és una malaltia autoimmunitària crònica caracteritzada per la pèrdua selectiva de les cèl·lules beta productores d'insulina del pàncrees. La seva etiologia no està clara encara, però es creu que té un origen multifactorial que involucra factors genètics, ambientals i estocàstics. Quan es perd la tolerància als autoantígens, es produeix una infiltració dels illots pancreàtics per cèl·lules T CD8⁺, macròfags, cèl·lules T CD4⁺ i cèl·lules B, entre altres tipus cel·lulars que orquestren la seva destrucció. A la T1D la pèrdua de tolerància s'ha associat a l'existència de defectes funcionals i baixa freqüència de cèl·lules Treg i cèl·lules iNKT en ratolins NOD. Per tant, aquest estudi analitza la funció reguladora de les cèl·lules iNKT humanes aïllades de controls sans i de pacients amb T1D al debut clínic de la malaltia. Les dades mostren que les cèl·lules iNKT tenien la capacitat per suprimir la proliferació de les cèl·lules T efectores. Curiosament, la supressió era dependent de la secreció de citocina IL-13, fenomen que es va confirmar quan es recuperava la proliferació de les cèl·lules T efectores en bloquejar la IL-13 amb un anticòs monoclonal. En canvi, les cèl·lules iNKT derivades de pacients T1D no presentaven capacitat supressora i aquest defecte funcional es va poder relacionar amb una disminució en la secreció d'IL-13. Atès que les cèl·lules iNKT poden modular la funció d'altres cèl·lules immunes, es va analitzar la seva capacitat per cooperar amb cèl·lules Treg i millorar la seva funció reguladora, prevenint millor la destrucció de les cèl·lules beta. Els resultats van mostrar que les cèl·lules iNKT individus sans tenien un efecte adjuvant en la supressió de cèl·lules T efectores per cèl·lules Treg. L'efecte adjuvant era dependent de la secreció de la citocina IL-13 i independent del contacte cèl·lula-cèl·lula.

Per entendre el possible paper d'aquestes cèl·lules reguladores a la T1D, es va analitzar la freqüència, la localització anatòmica i la funcionalitat al pàncrees de pacients amb T1D. La freqüència d'ambdós tipus cel·lulars augmentava al pàncrees al debut de la T1D però gairebé desapareixien al pàncrees dels pacients de llarga evolució. Aquests resultats contrastaven amb els obtinguts a ratolins NOD, on la freqüència d'aquestes dues poblacions seguia augmentant a l'etapa diabètica. La distribució també Les cèl·lules iNKT i Treg presentaven una distribució diferencial dins i al voltant dels illots pancreàtics i al teixit exocrí que canviava amb la progressió de la diabetis. Al debut de la malaltia les cèl·lules Treg eren reclutades als illots pancreàtics, mentre que les cèl·lules iNKT es mantenien preferentment al teixit exocrí. Finalment, les cèl·lules iNKT i Treg aïllades del pàncrees d'un pacient amb T1D eren funcionals, és a dir, que les cèl·lules iNKT eren específiques per al glicosfolípid α GalCer i les cèl·lules Treg suprimien la proliferació de les cèl·lules T efectores.

Per tant, el conjunt de dades mostrava que alteracions en la secreció d'IL-13 per cèl·lules iNKT a l'inici de la malaltia podrien conduir a la progressió de la resposta autoimmunitària a la Diabetis tipus 1. A més, la seva cooperació amb cèl·lules Treg i la presència dels dos tipus cel·lulars a l'òrgan diana de la resposta suggerien que la seva cooperació pot tenir lloc *in situ* i controlar així la destrucció de les cèl·lules beta pancreàtiques. Per tant, les noves dades sobre la funció reguladora de les cèl·lules iNKT, la identificació de glicosfolípids que milloren la secreció d'IL-13 per cèl·lules iNKT i la cooperació de Treg i cèl·lules iNKT, proporcionen un punt de partida per al disseny de noves estratègies terapèutiques que permetin eludir les restriccions de les immunoteràpies amb cèl·lules restringides per MHC.

Abstract

Type 1 Diabetes is a chronic autoimmune disease characterized by the selective loss of insulin producing pancreatic β cells. Its etiology is unclear yet but is thought to have a multifactorial origin involving genetic, environmental and stochastic factors. When tolerance to autoantigens is lost, there is an infiltration of the pancreatic islets with $CD8^+$ T cells, macrophages, $CD4^+$ T cells and B cells, among other cell types that orchestrate their destruction. In T1D tolerance breakdown has been associated to the existence of functional defects and low frequencies of $Foxp3^+$ Treg and iNKT cells in NOD mice. Therefore this study analyzes the regulatory function of human iNKT cells isolated from PBMCs of healthy controls and T1D patients at disease onset. The data show that iNKT cells have the capacity to suppress the proliferation of T effector cells. Interestingly suppression is dependent on the secretion of the cytokine IL-13, a phenomenon that was confirmed when using a blocking antibody to IL-13 resulted on the recovery of T effector cell proliferation. Conversely, regulation was impaired in iNKT cells derived from T1D patients and this functional defect could be related to a decrease in the secretion of IL-13. Since iNKT cells can modulate the function of other immune cells, we analyzed their capacity to interact with Treg cells and improve their regulatory function to better prevent the destruction of pancreatic β cells. The results showed that healthy individuals' iNKT cells had an adjuvant effect on the suppression of T effector cells by Treg cells. The contribution of iNKT cells was again dependent on the secretion of the immunoregulatory cytokine IL-13 and independent of cell-cell contacts.

To understand the possible role of these regulatory cells in T1D, their frequency, anatomical localization and functionality was studied in the pancreas of patients with T1D. We quantified the number of iNKT and Treg cells at different stages of the disease development both in human and NOD mice samples and we analyzed their distribution in and around the pancreatic islets and the exocrine tissue compartment. iNKT and Treg cells showed a differential distribution at disease onset as Tregs were concentrated inside the pancreatic islets while iNKT cells were mainly located in the exocrine tissue. Further, both populations almost disappeared from the pancreas of long-term T1D patients. These results contrasted with those obtained from NOD mice where the frequency of these two populations continued to rise at the diabetic stage. In addition, iNKT and Treg cells isolated from the pancreas of a T1D patient at disease onset were both functional, that is to say that iNKT cells were specific for the glycosphingolipid α GalCer and the Treg cells suppressed the proliferation of T effector cells.

Therefore, the set of data shows that alterations in the secretion of IL-13 by iNKT cells at disease onset could lead to the progression of the autoimmune response in T1D. Their cooperation with Treg cells and the presence of both cell types at the target organ of the autoimmune response suggests that their cooperation can take place *in situ* controlling the destruction of the pancreatic β cells by autoreactive T cells. Thus, the new data on the regulatory function of iNKT cells, the identification of glycosphingolipid agonists enhancing iNKT cells' IL-13 secretion and the cooperation of Treg and iNKT cells to regulate autoreactive T cells provide a starting point to the design new therapeutic strategies that bypass the constraints of the MHC-restricted immunotherapies.

Introducció

I.1. Autoimmunitat

El sistema immunològic està focalitzat en poder respondre d'una manera eficaç i ràpida, a una gran varietat d'antígens estranys procedents de virus, bacteris, fongs i paràsits. El sistema immune té una tendència intrínseca d'evitar atacar estructures pròpies, ja que ha estat desenvolupat com a sistema de protecció de l'organisme contra agents externs potencialment patogènics. Quan aquest sistema de protecció no funciona correctament, el sistema immunològic pot atacar als teixits propis produint les anomenades malalties autoimmunitàries. La prevenció de les malalties autoimmunitàries contra antígens propis pot ser previnguda per la tolerància central i la tolerància perifèrica [1].

I.1.1 Tolerància central

La tolerància central té com a finalitat eliminar el repertori de cèl·lules T potencialment autoreactives que podrien ser generades al timus. A nivell tímic, AIRE es ben conegut per ser un regulador transcripcional, el qual és essencial per duu a terme la selecció negativa i per l'expressió promiscua de TRAs (antígens restringits a teixits perifèrics) en cèl·lules epitelials tímiques medul·lars (mTECs), els quals són exclusivament depenent de AIRE [2,3]. Ratolins knock-out per AIRE (Aire^{-/-}) manifesten símptomes de autoimmunitat i pacients amb mutacions en AIRE desenvolupen la malaltia de poliendocrinopatia autoimmune candidiasis distròfia ectodèrmica (APECED) [4]. La expressió de AIRE és regulada per membres de la família de factor de necrosi tumoral (TNF) i per CD40. Més recentment, s'ha observat que hi ha gens TRA que s'indueixen en absència de AIRE. Així, s'ha trobat que un nou factor de transcripció anomenat Fezf2, exclusivament expressat en mTEC a timus, juga un paper important en l'expressió de TRA i en l'establiment de la tolerància central independentment de AIRE [5]. Ratolins knock-out per Fezf2 desenvolupen un fenotip autoimmunitari amb producció d'autoanticossos i infiltració de cèl·lules inflamatòries. Per tant, l'expressió de Fezf2 també és essencial per establir la tolerància central .

I.1.1 Tolerància perifèrica

La tolerància perifèrica és coneix com la capacitat de bloquejar l'activació de limfòcits madurs autoreactius impeding la resposta immune contra un antigen específic. Senyals coestimuladores són necessàries perquè es dugui a terme l'activació dels limfòcits T

autoreactius, per tant, l'absència d'aquest tipus de senyalització pot promoure la tolerància perifèrica.

Hi ha certs mecanismes de tolerància perifèrica per evitar l'activació dels limfòcits autoreactius i que aquests passin a ser cèl·lules efectores agressives i patogèniques. Els mecanismes de tolerància perifèrica són els següents; (a) Ignorància clonal: degut a la presència de barreres anatòmiques de l'organisme que fa que les cèl·lules T autoreactives no reconeguin cèl·lules pròpies; (b) Supressió clonal: degut principalment a cèl·lules T reguladores, les quals inhibeixen la proliferació i funció de cèl·lules T autoreactives, entre altres mecanismes per la secreció de citocines reguladores (c); Delecció clonal: Inducció de la mort cel·lular per l'apoptosi a través de la interacció Fas-FasL i (d) Anergia Clonal; inactivació funcional dels limfòcits degut a l'absència de expressió de molècules coestimuladores.

Quan es trenca la tolerància central o la perifèrica, es desencadena la resposta a autoantígens que si té conseqüències clíniques, donarà lloc a una malaltia autoimmunitària. En funció dels antígens contra els quals va dirigida la resposta, les malalties autoimmunitàries es poden dividir en malalties autoimmunitàries específiques d'òrgan i/o no específiques d'òrgan o sistèmiques, en aquesta última, la resposta està dirigida contra antígens que s'expressen a diferents òrgans. Com a exemples d'autoimmunitat sistèmica, tenim el lupus eritematoso sistèmic (LES) i l'artritis reumatoide, entre d'altres (Fig. 1).

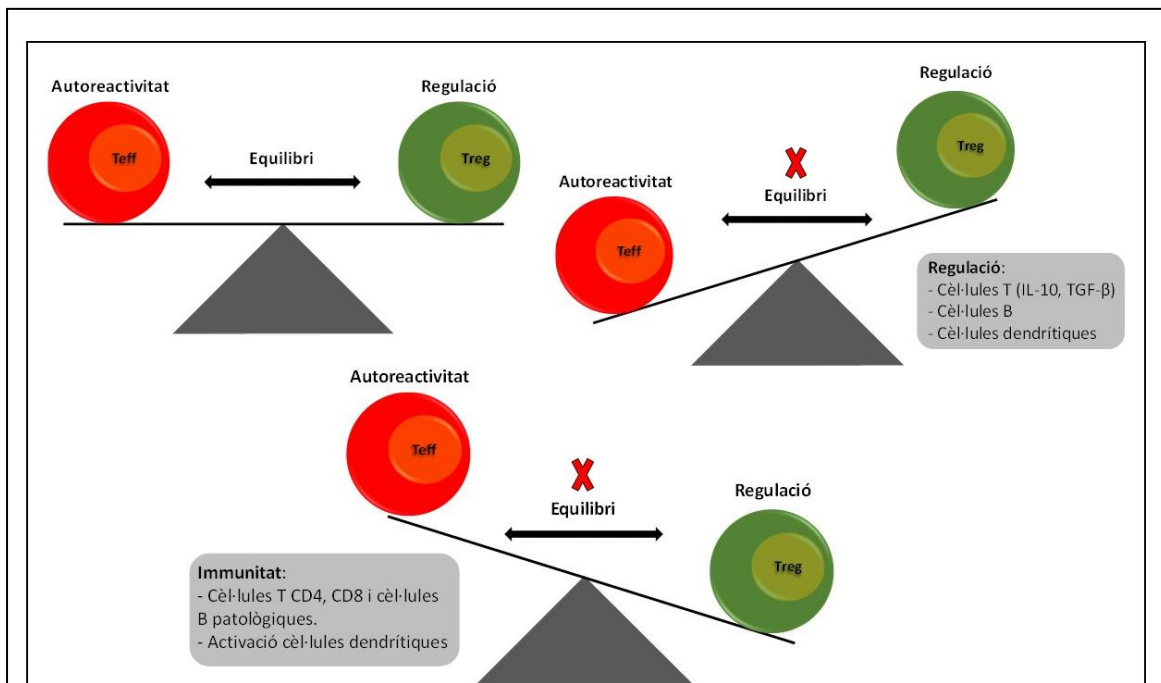


Figura 1. Homeòstasi del sistema immunològic. Les patologies autoimmunitàries són degudes a un trencament de la tolerància, produint un desequilibri entre la resposta efectora i la reguladora. Dins de la resposta reguladora intervenen diferents tipus cel·lulars, així com cèl·lules T i B reguladores i cèl·lules dendrítiques amb característiques tolerogèniques. (Adaptat

de S.Alice Long and Jane H. Buckner. CD4+Foxp3+ T Regulatory Cells in Human Autoimmunity: More Than a Numbers Game. J.Immunol. 2011; 187:2061-2066).

I.2. Diabetis tipus 1 (T1D)

La diabetis tipus 1 (T1D) és una malaltia autoimmunitària òrgan específica, ja que la resposta està dirigida contra antígens específics d'òrgans. La T1D és una malaltia crònica on les cèl·lules β productores d'insulina localitzades als illots pancreàtics o illots de Langerhans, que és la part endocrina del pàncrees, són gradualment destruïdes per cèl·lules T autoreactives.

I.2.1 Epidemiologia

La T1D és una de les malalties cròniques més comuns a la població infantil tot i que també pot manifestar-se a d'altres edats. La incidència varia significativament segons la regió geogràfica.

Els països del nord d'Europa tenen la incidència més alta de T1D on hi ha > 20/100000 pacients/any. Estats Units té un incidència de 17,8/100000 pacients/any i Xina i Sud-Amèrica tenen la incidència més baixa < 1/100000 pacients per any [6]. La taxa de diagnòstic està incrementant a la majoria dels països, amb una taxa dramàticament incrementada en nens de menys de 5 anys d'edat [7]. L'edat aproximada del diagnòstic ronda l'adolescència, amb un pic entre els 12-14 anys [8], tot i que continua sent més notable entre 0-5 anys [7]. El risc de desenvolupar T1D és més alt en dones que en homes [9], així com d'altres malalties autoimmunitàries on la prevalença també és més gran en un gènere o en un altre.

I.2.2 Etiologia

La T1D és una malaltia d'etiologia desconeguda, tot i que es considera multi-factorial, amb un component genètic i ambiental. Tot i així també intervenen factors psicosocials i estocàstics.

I.2.2.1 Factors genètics

Tot i que la T1D és una malaltia poligènica, els gens més importants que contribueixen a la susceptibilitat d'aquesta, estan localitzats en el locus de HLA de classe II al cromosoma 6, a més d'estar implicats d'altres gens o regions genètiques que han estat associades a T1D [10]. A vegades, menys d'un 10% dels individus amb susceptibilitat

acaben progressant a la malaltia clínica. Això fa, que factors addicionals siguin necessaris per activar la destrucció de les cèl·lules β a individus genèticament predisposats. Dependent de l'edat del debut de la malaltia, del 30-50% dels pacients amb T1D són heterozigots per a HLA-DQA1*0501 DQB1*0201 (DQ2) i DQA1*0301 DQB1*0302 (DQ8) associats als al·lels DR3 i DR4. La molècula HLA-DQA1*0102 DQB1*0602 (DQ6) associada a DR2 està relacionada amb una protecció dominant respecte a la malaltia [11].

I.2.2.2 Factors ambientals

Sobre la predisposició genètica, es postula que actuen certs factors ambientals que poden desequilibrar la balança de l'homeòstasi immunitària cap al desenvolupament d'un procés d'autoimmunitat. El factors ambientals en la implicació de la T1D es va demostrar en estudis on bessons univitel·lins que comparteixen el 100% dels haplotips, la concordància de la T1D va ser menor del 50% [12]. El processos ambientals augmenten el risc d'activar poblacions més o menys minoritàries de cèl·lules autoreactives prèviament circulants fins a tal punt, que els mecanismes de regulació ja no poden compensar aquest desequilibri i es comencen a desencadenar processos d'autoimmunitat. Alguns dels factors que s'han associat a la T1D són, agents infecciosos, la dieta, la higiene, factors psicosocials i fins i tot, factors estocàstics, entre d'altres etc.

Fins ara, cap agent infecció ha estat causant directe de la T1D a humans, tot i que si que han estat relacionats d'una manera indirecte, ja que podrien ajudar a iniciar o desencadenar la resposta autoimmunitària contra les cèl·lules β pancreàtiques. Dades epidemiologies han relacionat certs tipus de virus amb el desencadenament de la T1D. Per una part, diferents estudis han relacionat les infeccions per enterovirus en nens, amb la presència d'anticossos anti-illot, ja que diferents estudis han mostrar una major freqüència d'infeccions per enterovirus en aquest nens [13]. D'altres virus que també han estat relacionats amb la T1D són el Coxsackie, citomegalovirus, virus de la rubeòla entre d'altres, on diferents pacients amb T1D presenten IgM contra diferents epítops d'aquests virus [14,15,16,17], els quals es postula que poden alliberar a l'organisme nous antígens derivats de l'estrès metabòlic o processos inflamatoris [18], molècules proinflamatòries o mimòtops [19,20]. Els coxsackievirus B mostra un cert tropisme amb les cèl·lules β i s'ha observat resposta de cèl·lules T contra aquest virus en pacients amb T1D [21]. A més a més, a pacients diabètics s'ha observat la presència de IFNs de tipus 1 els quals estan relacionats amb infeccions virals [22].

Diferents bacteris també han estat associats a la T1D, ja que diferents estudis han observat en humans, infeccions per *Mycobacterium avium* més freqüentment en sèrum de pacients amb T1D que a individus controls [23]. Fins i tot, s'ha postulat que alteracions en la microbiota intestinal podrien també estar associades amb la predisposició de la T1D degut a canvis en la permeabilitat intestinal i el sistema mucosal de l'intestí.

I.2.3 Òrgan diana de la T1D: El pàncrees

El pàncrees és l'òrgan diana de la resposta autoimmunitària a la T1D. Es divideix en tres parts: cap, cos i cua (Fig. 2). Està format per tres teixits principals: el teixit exocrí, l'endocrí i els ductes pancreàtics. El teixit exocrí constitueix un 99% del total del pàncrees i està format bàsicament per cèl·lules secretores que estan agrupades en els anomenats acins pancreàtics. La seva funció principal és la producció d'enzims digestius (amilasa, lipasa, DNasa, Rnasa entre altres) necessàries per la digestió de l'organisme.

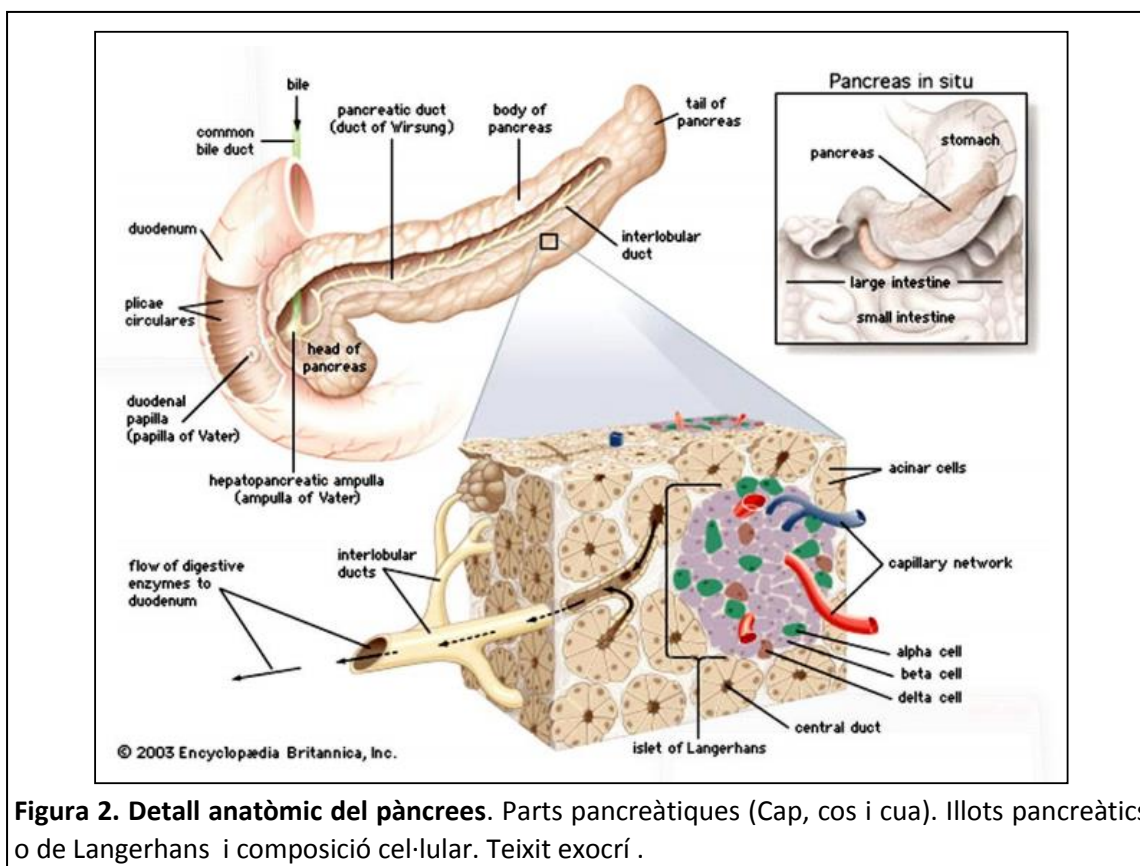


Figura 2. Detall anàtic del pàncrees. Parts pancreàtiques (Cap, cos i cua). Illots pancreàtics o de Langerhans i composició cel·lular. Teixit exocrí .

La part endocrina corresponent als illots de Langerhans o illots pancreàtics, representen un 1-2% de la massa total del pàncrees i es troben dispersos per tot el teixit exocrí. Estan separats de la part exocrina del pàncrees per una càpsula connectiva formada per cèl·lules glials (cèl·lules de Schwann) [24]. Els illots pancreàtics, són estructures petites molt importants per a la homeòstasi de la glucosa. Es calcula que hi ha aproximadament un milió d'illots en un pàncrees humà i uns 500 en un pàncrees de ratolí. Els illots pancreàtics estan formats per acumulacions de diferents tipus cel·lulars que produeixen i segreguen diferents tipus d'hormones relacionades amb la homeòstasi de la glucosa, així com: cèl·lules β , productores d'insulina, cèl·lules α productores de glucagó, les cèl·lules δ que secreten somatostatina, les cèl·lules PP que produeixen el polipèptid pancreàtic (PPY) i les cèl·lules ϵ secretores de ghrelina. La estructura i disposició d'aquests tipus cel·lulars als illots pancreàtics depèn de l'espècie animal considerada. Les cèl·lules β són les cèl·lules majoritàries als illots pancreàtics constituint un 70% de les cèl·lules totals, les cèl·lules α constitueixen un 20%, les δ un 10% i en un < 5% les cèl·lules PP i les cèl·lules ϵ secretores de ghrelina [25,26] (Fig. 3).

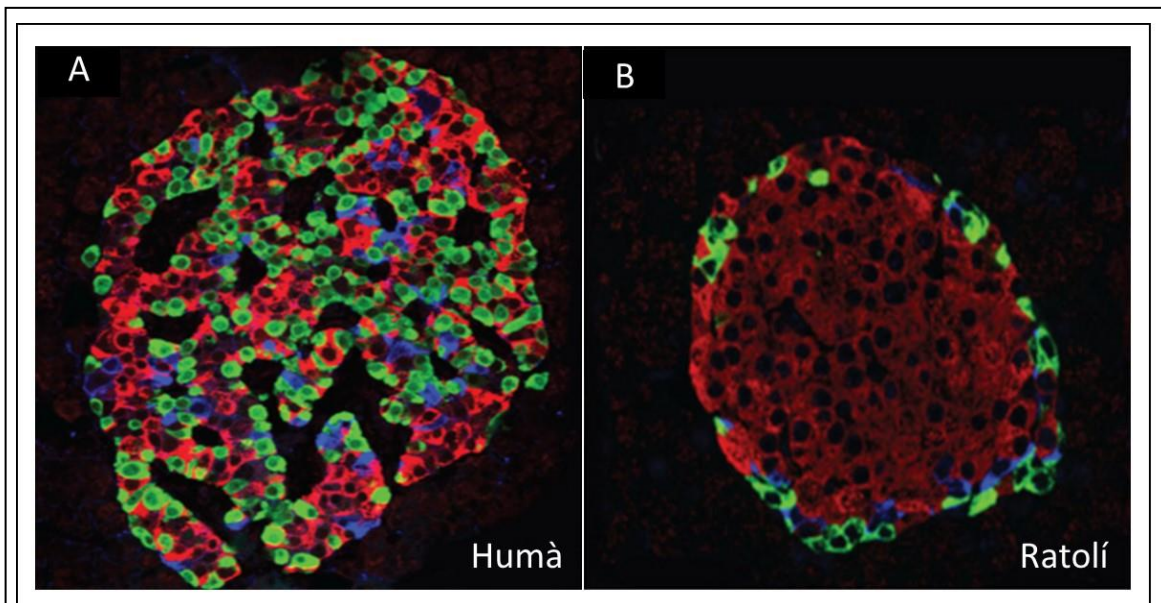


Figura 3. Immunohistoquímica d'illots pancreàtics d'humà (A) i de ratolins (B). Micrografia realitzada amb microscopi confocal (seccions òptiques de 1- μ m). A la micrografia s'observen les cèl·lules β productores d'insulina (vermell), les cèl·lules α secretores de glucagó (verd) i les δ , secretores de somatostatina (blau). A humans (A) els diferents tipus cel·lulars es troben distribuïts a l'illot pancreàtic a l'atzar. Pel contrari, a ratolins (B) les cèl·lules β es localitzen a la part central i les α i les δ secretores de somatostatina es localitzen a la perifèria dels illots. (Adaptat de: Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103:2334-9).

I.3 Desenvolupament de la T1D

Degut a les característiques del pàncrees, poques biòpsies s'ha pogut obtenir de pàncrees humans, ja que degut al seu alt contingut d'enzims digestius, fa que el teixit sigui propens a una ràpida autòlisi [27]. La falta de material humà ha fet que molts dels estudis s'hagin fet en models animals. El ratolí NOD és el model escollit pels investigadors per estudiar el procés i desenvolupament de la T1D. Tot i així, la histopatologia de la insulitis, és diferent entre individus amb T1D i ratolins NOD.

I.3.1 Model animal de T1D: Ratolí NOD

El model de ratolí NOD (non-obese diabetic) és el model animal prototip de autoimmunitat humana, ja que els ratolins NOD desenvolupen diabetis espontània amb característiques similars a la T1D humana, així com hiperglucèmia i presència d'autoanticossos directament en contra dels illots pancreàtics [28]. Els ratolins NOD són propensos a una desregulació immune global. La insulitis observada a ratolins NOD és molt més elevada que la que es troba a humans. El desenvolupament i progressió de la T1D a ratolins NOD ha estat relacionada principalment amb cèl·lules T, però també s'han vist defectes en diversos subgrup de leucòcits, incloïnt cèl·lules T CD4⁺, T CD8⁺, cèl·lules NK, cèl·lules dendrítiques i macròfags, així com defectes en cèl·lules NKT, deficiències en cèl·lules Treg i fins i tot l'absència de C5a del complement [29,30,31,32]. Tot i així, la T1D a ratolins NOD està caracteritzada principalment per la presència de limfòcits T, que actuen com a cèl·lules efectores de l'autoimmunitat destruint les cèl·lules β productores d'insulina. Els limfòcits T diabetogènics presents durant el desenvolupament de la malaltia a pàncrees de ratolins NOD, reconeixen bàsicament antígens insulars (insulina, GAD, IA-2, Hsp60 entre d'altres)[33]. Durant el progrés de la malaltia no només hi ha una destrucció de les cèl·lules β , sinó que també hi ha una destrucció de la capa peri-insular que recobreixen els illots pancreàtics, formada per cèl·lules de Schwann [34].

I.3.1.1 Fases del desenvolupament de la T1D a Ratolins NOD

El desenvolupament de la T1D a ratolins NOD es pot dividir en 3 etapes (Fig. 4):

1) Ratolins NOD pre-T1D: 2-4 setmanes

Durant aquest període, aproximadament 2-4 setmanes després del naixement es produeix un anada de mort de cèl·lules β productores d'insulina on es generen grans quantitats d'antígens pancreàtics. Cèl·lules dendrítiques, entre d'altres APCs carregades d'antígens pancreàtics, migren als ganglis pancreàtics on els presenten a cèl·lules T, les quals un cop activades migren cap a l'òrgan diana de la resposta

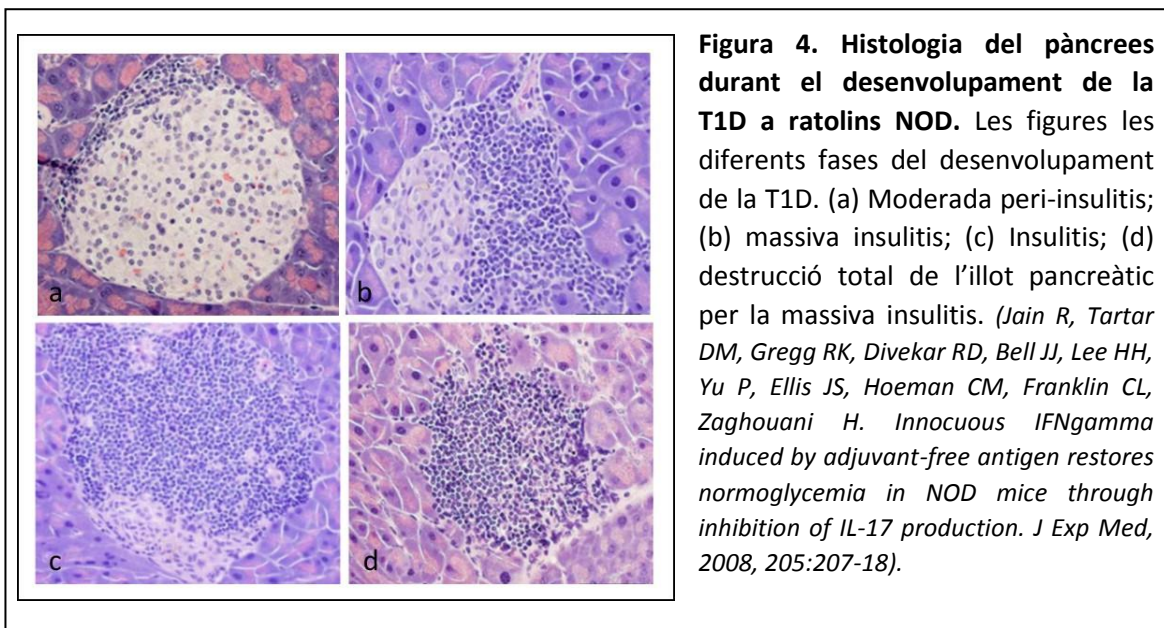
autoimmunitària, en aquest cas, el pàncrees. Durant aquest període, comença una discreta infiltració pancreàtica de cèl·lules autoreactives, procedent dels ganglis pancreàtics principalment formada per cèl·lules T CD8⁺, però també per cèl·lules T CD4⁺, així com cèl·lules B. A més a més, molècules d'adhesió com ICAM-1 comencen a expressar-se, així com a aparèixer depòsits de IgG en cèl·lules β .

2) Ratolins NOD al debut del a T1D: 8-14 setmanes

Durant aquest període, aproximadament a les 8-14 setmanes després del naixement, la insulitis es fa molt més evident ja que augmenten els processos inflamatoris així com la freqüència en els nivells d'infiltració que cobreix el 50-60% dels illots pancreàtics. En aquesta etapa, les cèl·lules infiltrants, sobretot cèl·lules T, són preferentment localitzades a la perifèria o al voltant dels illots pancreàtics, produint peri-insulitis. En aquest moment, les cèl·lules abasten tot l'illot i mostren cada vegada més l'organització espacial d'un òrgan limfoide terciari (TLO). Contràriament, a humans, no hi ha una exagerada peri-insulitis i no hi ha aquesta organització espacial en la formació de TLO [35]. La infiltració no és homogènia, ja que les cèl·lules es distribueixen per tota la glàndula [36]. En aquest període, s'observa un increment en l'expressió de molècules d'adhesió, ICAM-1 i VCAM-1 [37].

3) Ratolins NOD diabètics : > 20 setmanes

En aquesta etapa, el número de cèl·lules infiltrants, continua incrementant. A la setmana 17 aproximadament, el 58% dels illots pancreàtics presenta una massiva peri-insulitis i un 5 % mostra intra-insulitis, associada a la destrucció de les cèl·lules β . A la setmana 18, la majoria dels illots estan afectats i la massa de cèl·lules β disminueix gradualment. Finalment, a la setmana 20, tots els illots estan afectats, desproveïts de cèl·lules β i lliures d'infiltrats inflamatoris [38,39].



I.3.1.2 Fases del desenvolupament de la T1D a humans

El desenvolupament de la T1D a humans, és més complex que a ratolins NOD, ja que el seu estudi ha estat més complicat degut a la dificultat d'aconseguir biòpsies de pàncrees humà. Un dels problemes a humans, és que el procés immunològic que condueix a la diabetis comença anys abans de la simptomatologia i del debut clínic de la malaltia, el que dificulta el seu estudi en etapes anterior al debut [40]. La T1D humana, al igual que passava amb ratolins NOD, també la podem dividir en diferent fases (Fig. 5).

1) Individus pre-diabètics

Aquesta fase es caracteritza principalment per la presència de autoanticossos contra antígens dels illots pancreàtics [41, 42]. El número de autoanticossos contra diferents antígens dels illots pancreàtics (GAD65, IA2, IGRP, insulina i ZNT8), així com la disglucèmia a nivell sanguini, són factors molt importants a l'hora de determinar l'estat de pre-diabètic. Durant aquesta etapa una onada de mort de cèl·lules β pancreàtiques genera antígens pancreàtics, els quals són presentats a cèl·lules T als ganglis pancreàtics activant d'aquesta manera una resposta específica contra el pàncrees. Durant aquest període, la infiltració de cèl·lules limfoides a pàncrees humà és molt baixa i per tant, la majoria dels illots pancreàtics estan intactes.

2) Individus al debut de la malaltia

Durant aquesta etapa és quan és diagnòstica la T1D, degut a l'augment d'autoanticossos així com un increment en els nivells de glucosa en sang. En aquesta etapa la major part del illots pancreàtics estan destruïts, ja que com hem dit abans, uns dels inconvenients de la T1D, és que la resposta immunitària contra el pàncrees comença molt abans del diagnòstic clínic de la malaltia. En alguns casos, s'ha observat que individus al debut encara tenen illots pancreàtics amb una proporció normal d'insulina i són lliures d'infiltrats leucocitaris.

2.1) Fase "Honeymoon"

Durant aquesta fase, també coneguda com a fase de remissió de la T1D pot representar un període quiescent de la malaltia. Normalment, comença a les setmanes següents al diagnòstic i es caracteritza principalment, per una reducció temporal dels requeriments d'insulina, millorant els nivells de glucosa en sang. Tot i així, normalment aquest període va seguit d'un empitjorament de la malaltia a l'engròs.

3) Individus Diabètics

Durant aquesta etapa, pràcticament tots els illots pancreàtics estat destruïts i el pacient és incapaç de controlar els nivells de glucosa en sang. Curiosament, a pacients amb T1D anys després del diagnòstic s'ha detectat apoptosi de cèl·lules β i presència d'infiltrats leucocitari, suggerint l'existència de mecanismes de regeneració de la part endocrina del pàncrees [43]. Els processos inflamatoris generats durant aquest procés, poden produir una millora en la presentació antigènica, degut a l'increment de l'expressió de molècules de MHC de classe I. Tot i això, la capacitat de renovació de les cèl·lules β a humans està molt limitada. A partir d'aquest moment, el curs de la malaltia continua endavant, on amb els anys (procés lent) tots els illots pancreàtics acaben sent destruïts i la falta d'insulina arriba a ser considerable. Tot i així, diferents estudis realitzats a pacients amb T1D crònica, s'observà un nombre variable de cèl·lules β residuals i una mitjana d'un 13% dels illots pancreàtics que encara contenen insulina [44,45,46,47].

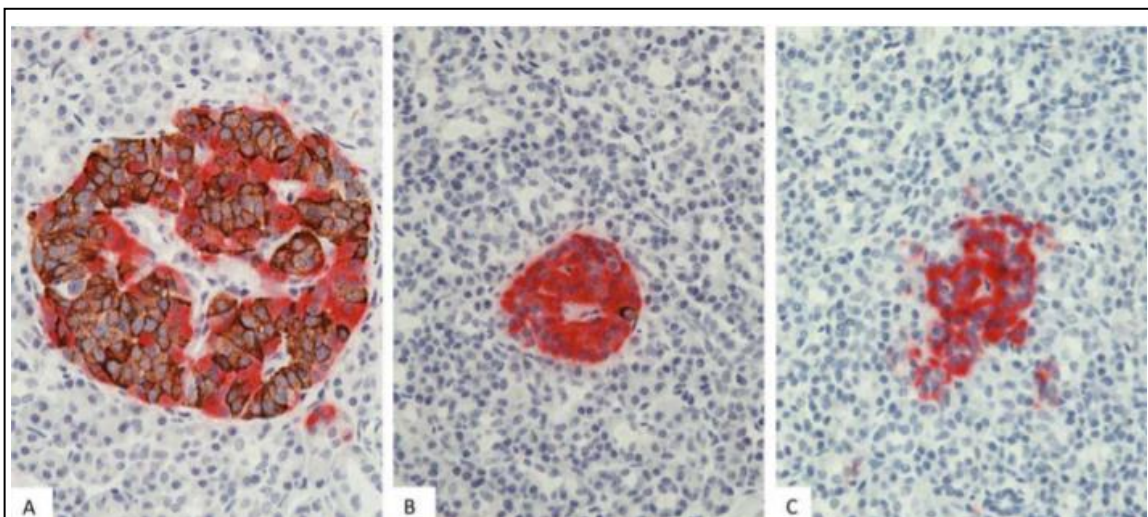


Figura 5. Histologia del pàncrees durant el desenvolupament de la T1D a humans. Les imatges mostres; A) Illots en la fase inicial de la peri-insulitis amb presència de cèl·lules β (marró) i cèl·lules α (vermell). B) Illots on moltes cèl·lules β han sigut destruïdes. C) illots totalment destruït sense cèl·lules productores d'insulina. L'arquitectura del pàncrees es va modificant durant la progressió de la T1D. (Morgan NG, Leete P, Foulis AK, Richardson SJ. Islet inflammation in human type 1 diabetes mellitus. IUBMB Life. 2014; 66:723-34)

I.4 Immunopatogènesi de la T1D

I.4.1 Autoimmunitat contra les cèl·lules β

Tal i com s'ha dit anteriorment, a vegades el sistema immunitari no pot distingir entre el que és propi i el que no ho és i per tant, actua responent contra proteïnes pròpies (autoantígens). Aquesta resposta contra antígens propis pot desembocar en una malaltia autoimmunitària. Així, en el cas de la T1D, la resposta va dirigida directament contra antígens de les cèl·lules β pancreàtiques. En aquesta resposta està implicat un component cel·lular i un component humoral.

I.4.1.1 Component cel·lular

Als infiltrats pancreàtics observats durant el desenvolupament de la malaltia, és possible trobar diversos tipus cel·lulars, tot i que generalment predominen les cèl·lules T CD8⁺, seguit de les cèl·lules T CD4⁺ [48,49,50] per això, són considerades els principals elements efectors de l'autoimmunitat contra les cèl·lules beta. Aquestes cèl·lules, promouen la insulitis, la qual és un signe patognomònic de T1D al debut de la malaltia [35]. La insulitis, la podem definir com a un infiltrat de cèl·lules del sistema immunitari, on predominen els limfòcits i la qual està limitada als illots pancreàtics. A la T1D s'han descrit uns 150 epítops aproximadament reconeguts per limfòcits T CD4⁺ d'autoantígens com GAD65 entre d'altres i més de 20 epítops reconeguts per cèl·lules T CD8⁺ [33]. Altres estudis realitzats per Kent et al. [51] van demostrar el reconeixement de la insulina per limfòcits T provinents dels ganglis pancreàtics d'un pacient amb T1D DR4+. Els limfòcits específics per autoantígens també es poden observar en sang perifèrica. A part de cèl·lules T també s'han trobat cèl·lules B, macròfags i cèl·lules NK, entre d'altres [35]. La composició de l'infiltrat cel·lular, és específica de cada etapa del desenvolupament de la T1D.

I.4.1.2 Autoantígens

Un autoantigen és un antigen propi d'un individu, contra el qual es general una resposta immunitària. La resposta immunitària contra els autoantígens pot estar mediada per limfòcits o per anticossos. Els diferents autoantígens reconeguts a la T1D són específics dels illots pancreàtics, així com la Insulina i el IGRP , tot i que d'altres no ho són, així com GAD, IA-2, GFAP, etc.

I.4.1.3 Resposta Humoral: Autoanticossos

Les cèl·lules B CD20⁺ representen el segon tipus cel·lular, després de les cèl·lules T, més abundant als infiltrats dels illots pancreàtics, així com també les cèl·lules plasmàtiques CD138⁺, productores d'anticossos [48]. A debut de la malaltia la freqüència de cèl·lules B no és elevada en els infiltrants, però a etapes més tardanes les cèl·lules B s'elevan 4 vegades respecte a l'etapa inicial [35].

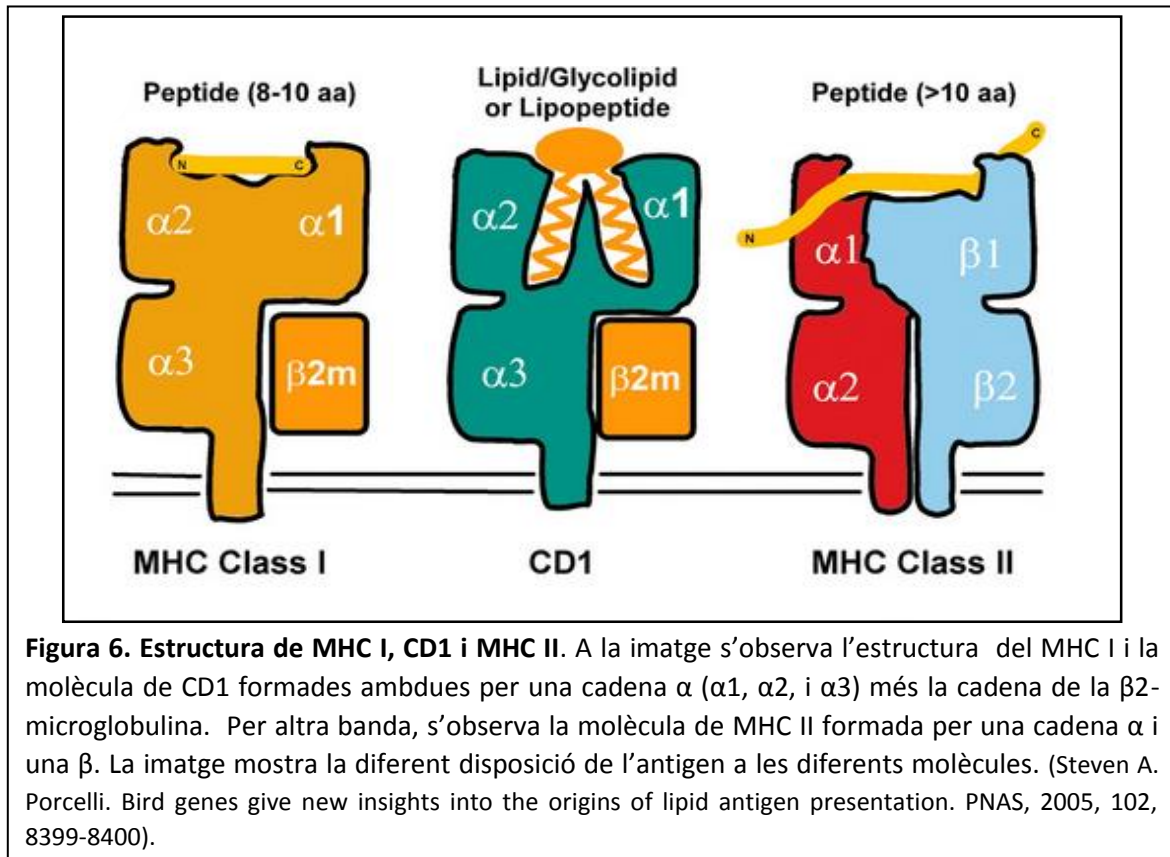
Els primers autoanticossos descrits a la T1D humana van ser els ICAs, els quals reconeixen diversos autoantígens presents als llocs pancreàtics [52] detectats en un 80% aproximadament a individus amb T1D [53]. Els autoanticossos IAA (anti-insulina) són els primers anticossos observats durant el debut de la malaltia [54]. A part d'aquest, també es troben d'altres com anti-GAD en un 85% d'individus diabètics [52], anti IA-2 (Proteïna tirosina fosfatasa) en un 70% [55] entre d'altres.

I.5 Cèl·lules iNKT

Tot i que les cèl·lules Tef CD4⁺ i T CD8⁺ són un component molt important durant el desenvolupament i progressió de la T1D, hi ha altres tipus de cèl·lules implicades.

I.5.1 Restricció per CD1

Les cèl·lules iNKT es caracteritzen per reconèixer antígens lipídics d'estructura diversa. Poden reconèixer tant lípids propis i/o endògens com lípids exògens d'origen microbià i/o fúngics. Aquests antígens són presentats per molècules de CD1 que són molècules no polimòrfiques, no clàssiques i que tenen una estructura similar a les molècules de MHC de classe I (Complex Major d'Histocompatibilitat de classe I). Les molècules de CD1 estan formades per una cadena α amb tres dominis ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) ancorada a la membrana i unida de manera no covalent a la $\beta 2$ -microglobulina, semblant a les molècules de MHC de classe I però a diferència de les molècules MHC de classe II, les quals estan formades per una cadena α i β amb dos dominis, $\alpha 1$ i $\alpha 2$ així com $\beta 1$ i $\beta 2$, ambdues ancorades a la membrana citoplasmàtica [56]. Les molècules de MHC I i les molècules de CD1 no només reconeixen antígens diferents (pèptids i lípids respectivament) sinó que la forma d'unió d'aquests a les molècules també és ben diferent. A les molècules de MHC l'antigen peptídic es disposa a sobre del lloc d'unió d'antigen ancorat en petites butxaques. A CD1, les cues lipídiques (cues d'hidrocarburs) dels antígens es disposen a l'interior del canals hidrofòbics que formen el lloc d'unió d'antigen deixant la part polar del mateix exposada a la superfície [57,58] (Fig. 6).



A humans s'han identificats 5 gens que codifiquen per molècules de CD1 (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d i CD1e, aquesta última intracitoplasmàtica) i a ratolins només s'ha descrit CD1d (CD1d1 i CD1d2). Les diferències en l'organització estructural dels canals hidrofòbics del lloc d'unió de l'antigen fan que cada molècula de CD1 reconegui un tipus determinat d'antigen lipídic.

I.5.2 Tipus d'antígens reconeguts

Les cèl·lules iNKT poden reconèixer tant antígens propis, com antígens procedents de patògens.

1) Antígens endògens i/o propi

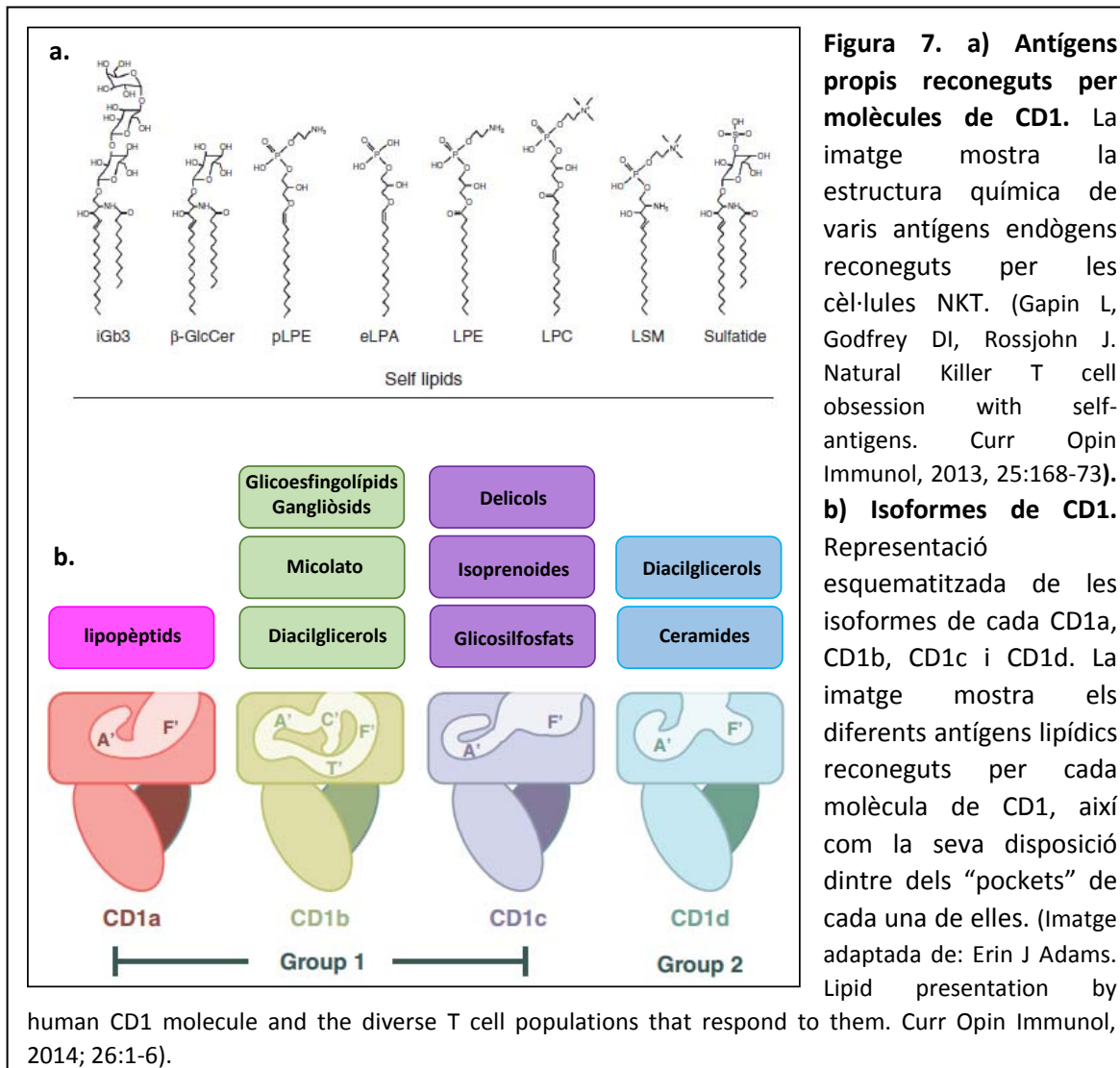
Un dels primers antígens activador de la cèl·lules iNKT va ser l'αGalCer derivat d'una esponja marina i fort agonista de l'activació de les cèl·lules iNKT. L'opinió general i actual, sosté que els mamífers no són capaços de sintetitzar glicosilceramides amb un enllaç α-glicosídic. Tot i així, diversos autors com Kain et al, 2014, van demostrar la presència de glicosilceramides formant un enllaç α, com l'αGalCer, a humans [59]. Recentment, es va demostrar l'existència d'una ruta metabòlica i la degradació que pot regular la presència de α- glicolípid en teixits de mamífers [59].

Diversos candidats com a autoantígens han estat identificats, els quals poden jugar un paper molt important influint a la selecció positiva de les cèl·lules iNKT durant la maduració tímica. Els autoantígens lipídics presentats per CD1d podrien ser diferents en cada etapa de desenvolupament generant una alta diversitat d'antígens propis. Dins dels possibles candidats d'autoantígens lipídics trobem l'iGb3 (Isoglobotrihexosilceramida), implicat inicialment en la selecció tímica de les cèl·lules iNKT a ratolins i per tant, un candidat que podria activar a les cèl·lules iNKT [139]. Tot i així, diferents anàlisis d'aïllament de glicolípid humans des de el timus i des de DCs perifèriques van fallar en la detecció de iGb3. A més a més, una funcional iGb3 sintasa és absent a humans, descartant d'aquesta manera la selecció positiva de cèl·lules iNKT a humans a partir d'aquest autoantigen [61].

La β -glucosilceramida (β GlcCer), precursor de molts glicoesfingolípids i un dels més abundats antígens propis, és considerat un bon candidat per poder activar les cèl·lules iNKT [62]. Però no obstant això, informes posteriors de la digestió enzimàtica de la β GlcCer comercial, van demostrar que la reactivitat iNKT probablement era per formes α -anomèriques co-purificades amb β -GlcCer [62]. D'altres autoantígens candidats serien la lisofosfatidilcolina (LPC) i lisosfingomelina (LSM), que són agonistes dèbils per a les cèl·lules iNKT humanes, però la seva presència es veu augmentada durant la resposta inflamatòria [63]. Per tant, diversos diferents auto-lípids, amb diverses estructures, podrien ser capaços de proporcionar senyals per al desenvolupament de les cèl·lules iNKT o activació, o potser totes dues, quan és presentat per CD1d (Fig. 7a).

2) Antígens lipídics no propis

Les cèl·lules iNKT no només tenen la capacitat de reconèixer antígens endògens sinó que també són capaces de reconèixer antígens lipídics derivats de diferents patògens [64,65,66]. Així, les molècules de CD1a reconeixen lipopèptids com DDM (Dialkyl Dihexadecylmalonate), les de CD1b lípid com els àcids micòlics, GMM (Glucose-Monomylate), PIM (Phosphatidylinositol-mannoside), LAM (Liporabino-mannose), CD1c que reconeix fosfoisoprenoides o glicofosfolípids i CD1d que uneix Glucosilfosfatidilinositol (Fig. 7b).



I.5.3 Fenotip

Segons la molècula de CD1 que reconeixen les cèl·lules NKT, aquestes es divideixen en dos grups:

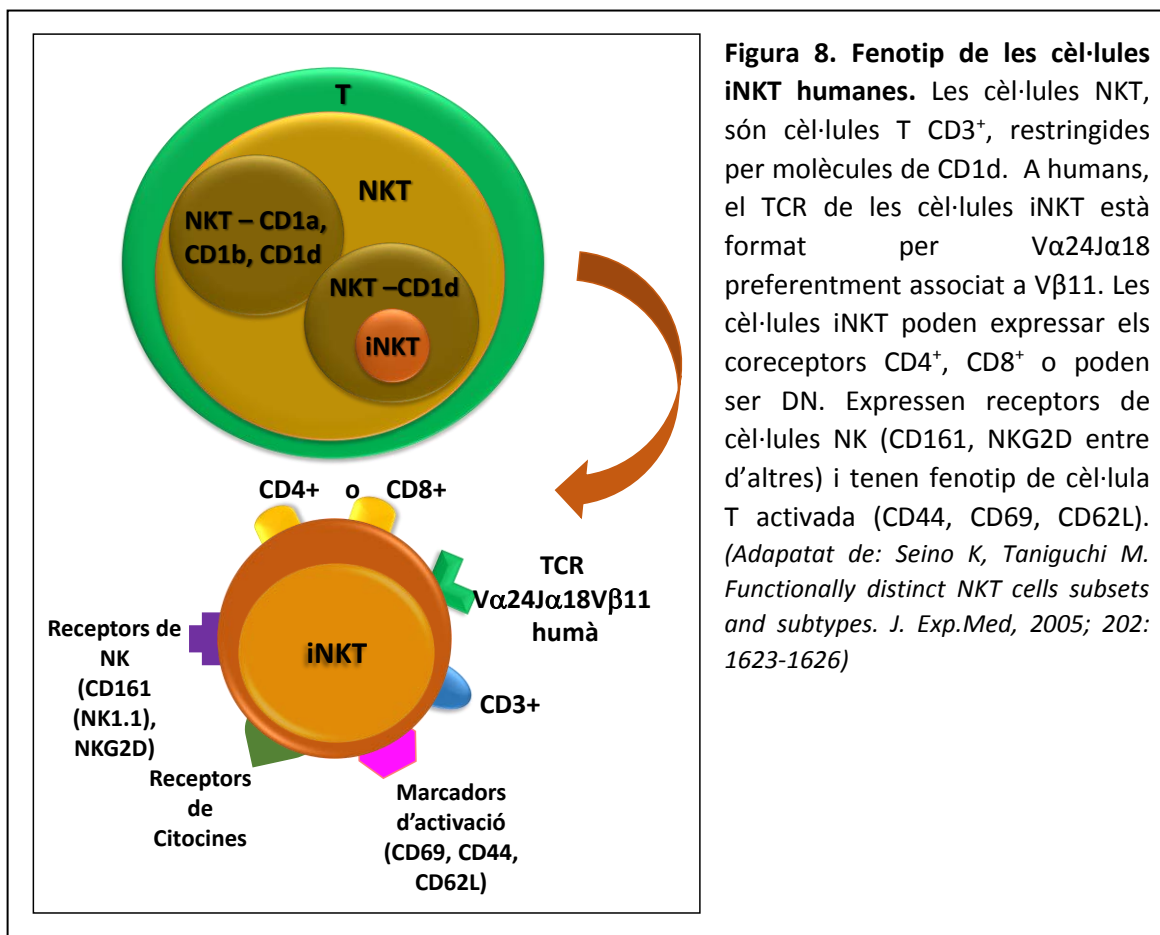
a) Grup 1: Cèl·lules NKT restringides per CD1a, CD1b i CD1c. Expressen un TCR divers.

b) Grup 2: Cèl·lules NKT restringides per CD1d. Aquest mateix grup es divideix en dos grups més en funció de la reorganització del TCR que presentin:

b.1) Cèl·lules iNKT invariants, semi invariants o clàssiques: Tenen una reorganització de la cadena α del TCR específica formada per $V\alpha 24J\alpha 18$ associat preferentment a $V\beta 11$ en humans. A ratolins està formada per $V\alpha 14J\alpha 18$ associat a $V\beta 8.2$, $V\beta 7$ i $V\beta 2$.

b.2) Cèl·lules iNKT amb un TCR divers: restringides per diferents cadenes α i β del TCR [67,68,69].

Les cèl·lules iNKT presenten una expressió heterogènia dels correceptors CD4 i CD8 i per tant, es troben cèl·lules iNKT que són CD4⁺, CD8⁺ i fins i tot, dobles negatives (CD4⁻, CD8⁻ (DN)), que constitueixen un 27%, 24% i 49% de les cèl·lules iNKT de perifèria, respectivament [70] i mostrant diferent perfil de citocines [71]. Les cèl·lules iNKT al llarg del seu desenvolupament tímic, adquireixen l'expressió de diferents marcadors de superfície de cèl·lules NK, com la lectina de tipus C (CD161 o NK1.1) i NKG2D entre d'altres com CD56 i CD94. Aquestes cèl·lules, presenten un fenotip de cèl·lula activada (CD69⁺, CD44^{high}, i CD62L⁻) i de cèl·lula memòria, així poden exercir funcions efectores sense l'activació via TCR [72]. Les cèl·lules iNKT tenen la capacitat de secretar grans quantitats de citocines tant del tipus Th1 (INF- γ) com Th2 (IL-4) d'una forma ràpida un cop són activades (Fig. 8).



I.5.4 Origen i desenvolupament

El desenvolupament de les cèl·lules iNKT és depenent del timus i es duu a terme a partir de precursors derivats de la medul·la òssia. El desenvolupament es duu a terme paral·lelament amb el de les cèl·lules T convencionals, començant a nivell del còrtex i experimentant una migració cortico-medul·lar durant el seu desenvolupament intratímic. La ramificació entre ambdues grups de cèl·lules T, es produeix en l'etapa de cèl·lules dobles positives (DP CD4⁺CD8⁺). L'inici del desenvolupament de les cèl·lules iNKT es produeix en el còrtex degut a la interacció TCR-glicolípid-CD1d. Timòcits del còrtex DP expressen a la seva superfície molècules de CD1d i presenten lípids endògens a d'altres timòcits DP per duu a terme la selecció positiva.

Molècules accessòries com SLAM (Signaling lymphocytic activation molecule) també estan implicades en el desenvolupament de les cèl·lules iNKT. La migració de les cèl·lules iNKT a la medul·la implica la sobrerregulació del receptor de quimiocines CCR7, tot i que també estan implicades les mTECs (cèl·lules epitelials tímiques). Per un correcte desenvolupament de les cèl·lules iNKT a nivell tímic, no només és important la presència de CD1d sinó que també és necessari un microambient amb l'implicació de citocines com la IL-15 i IL-7 secretades per cèl·lules tímiques estromals i necessàries per mantenir un correcte número de cèl·lules iNKT. A part de citocines, els diferents factors de transcripció implicats en les diferents etapes del desenvolupament de les cèl·lules iNKT i una estructura intacta a nivell tímic, també és molt important pel correcte desenvolupament de les cèl·lules iNKT (Fig. 9). A més del coreceptors CD4 i CD8, durant el seu desenvolupament, les cèl·lules iNKT també adquireixen un fenotip de cèl·lula memòria i de cèl·lula T activada. La seva diferenciació terminal implica l'adquisició de diversos marcadors de cèl·lules NK i la seva reactivitat és adquirida a perifèria a través d'interaccions depenent de CD1d [73,74,75].

I.5.5 Homeòstasi

El manteniment a perifèria del número de cèl·lules iNKT requereix de factors de creixement, així com de diverses senyals de supervivència. Tot i que a nivell de selecció tímica la molècula de CD1d és molt important pel seu correcte desenvolupament, les cèl·lules iNKT madures no requereixen d'una interacció continua amb CD1d per la seva proliferació, supervivència o la seva distribució als teixits [76]. La homeòstasi de les cèl·lules iNKT depèn en part i bàsicament, de citocines. Degut a la diversitat dels subgrups de cèl·lules iNKT, englobades en cèl·lules iNKT CD4⁺ o CD4⁻ (CD8⁺ i DN), els requeriments homeostàtics són diferents unes de les altres.

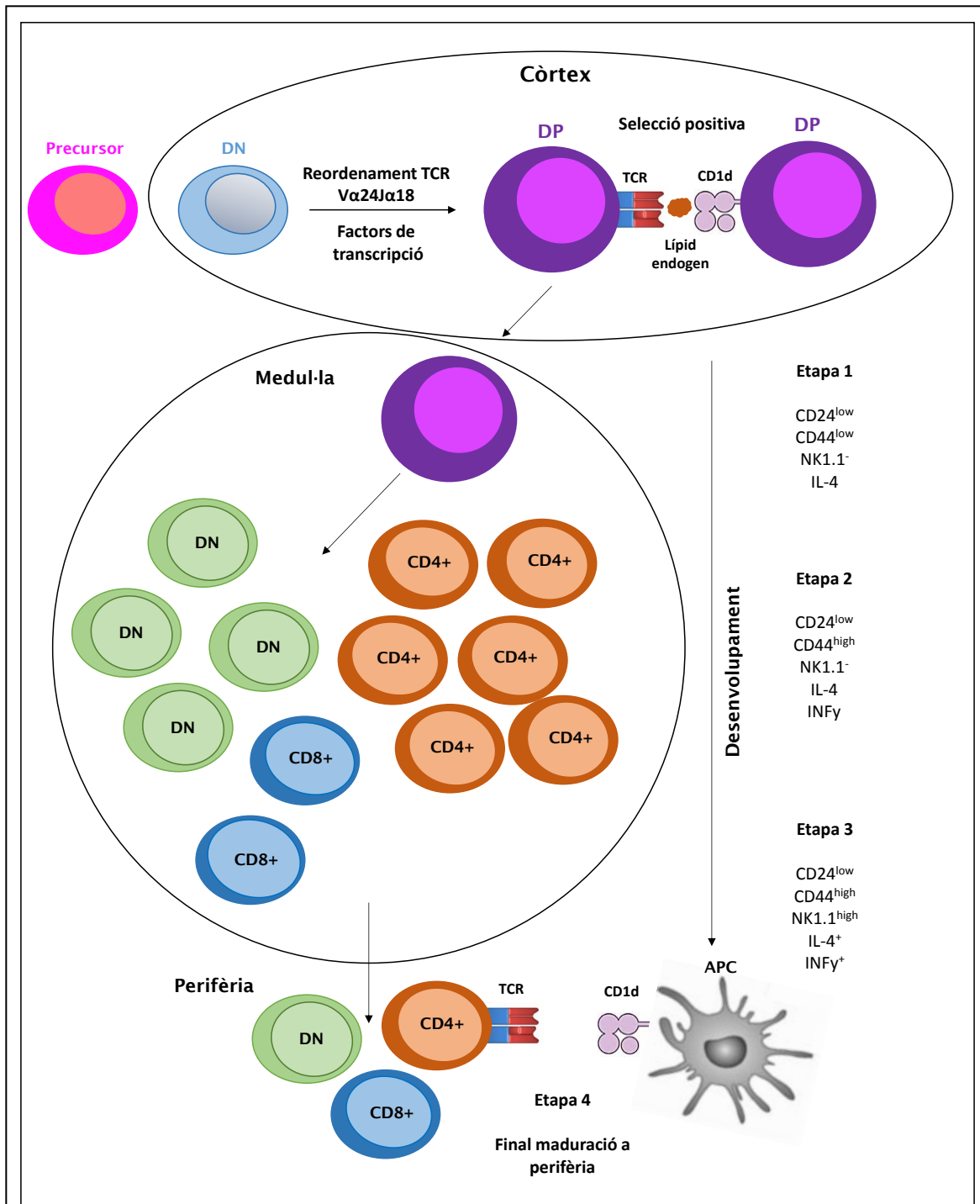


Figura 9. Desenvolupament tímic de les cèl·lules iNKT. Després del reordenament del TCR invariànt (V α 24J α 18 humans) de les cèl·lules iNKT a l'estat de DN, passen a DP on experimenten una selecció positiva a partir del reconeixement de lípids endògens presentat en el context de CD1d per timòcits corticals DP. Seguidament, aquests limfòcits passen a la medul·la per continuar amb el seu desenvolupament i adquirir l'expressió de certs marcadors superficials (CD69, CD44, CD161 (NK1.1), CD62L, CD24). Finalment migren a perifèria on acaben la seva maduració. (Adaptat de: Salio M, Silk JD, Jones EY, Cerundolo V. Biology of CD1- and MR1- Restricted T Cells. Annu Rev Immunol. 2014; 32:323-66).

Per una banda, les cèl·lules iNKT CD4⁺ expressen nivells més elevats de IL-7R que les cèl·lules iNKT CD4⁻. Contràriament, les iNKTs-CD4⁻ expressen més quantitat de IL-15R que les iNKTs-CD4⁺. Aquesta diferent expressió de receptors de citocines fa, que unes puguin respondre més i necessiten més IL-7 i les altres la IL-15. La IL-7 a part de ser secretada a timus i medul·la òssia també és produïda a òrgans limfoides secundaris, fent que es mantingui un cicle post-tímic de les cèl·lules iNKT CD4⁺ a perifèria. La IL-15 és secretada per varis teixits extralimfoides on les cèl·lules iNKT tendeixen a localitzar-se. Per tant, el número de iNKT-CD4⁺ és principalment mantingut per l'output tímic i IL-7, i la seva supervivència a perifèria és mantinguda per un limitat número de divisions cel·lulars. En canvi, el número de cèl·lules iNKT CD4⁻ (CD8⁺ i DN), majoritàriament depèn de la seva expansió a perifèria i de IL-15. Tot i així, no només les citocines són responsables de la homeòstasi de les cèl·lules iNKT, sinó que també són necessàries molècules co-estimuladores, com ICOS-ICOSL [77,78] així com una important freqüència, força i duració de l'estimulació antigènica [79].

Les cèl·lules iNKT es distribueixen a nivell sistèmic dins de diferents òrgans limfoides, com al timus, la melsa, nòduls limfàtics i fetge, aquest últim amb una freqüència de cèl·lules iNKT més elevada que la resta. A ratolins, representen aproximadament un 0,5% de la població de cèl·lules T en sang [66], en canvi, a humans només representen un 0,04- 1,3% dels limfòcits [80].

I.5.6 Cèl·lules iNKT i autoimmunitat

Diferents estudis han descrit la implicació de les cèl·lules iNKT en el desenvolupament d'una gran diversitat de malalties autoimmunitàries, així com; la T1D, malalties autoimmunitàries de la tiroide, Lupus, Encefalomièlitis Experimental Autoimmune, Artritis Reumatoide entre d'altres [81,82,66]. Generalment, les malalties autoimmunitàries, en models animals i en pacients han estat relacionades relacionat amb una baixa freqüència de cèl·lules iNKT. Per exemple, en models animals de EAE (Experimental autoimmune encephalomyelitis) s'ha vist un número reduït de cèl·lules iNKT i de baixos nivells de secreció de IL-4 [83]. A pacients amb RRMS (Relapsing-Remitting Sclerosis Múltiple) s'ha observat que la freqüència de cèl·lules iNKT està reduïda a sang perifèrica, així com el mRNA que transcriu pel TCR V α 24. Aquesta reducció de cèl·lules iNKT a pacients amb RRMS sembla coincidir amb la fase relapsing de la malaltia [84,85]. A pacients amb RA (Artritis Reumatoide) s'han vist baixos nivells de transcrits de TCR específic de les cèl·lules iNKT, així com nivells baixos d'expressió de CD1d [86]. D'altres malalties com Lupus també es caracteritzen per un nombre reduït de cèl·lules iNKT.

I.5.6.1 iNKT i T1D

La T1D és una de la malalties autoimmunitàries on hi ha més evidències de la implicació de les cèl·lules iNKT. La majoria dels treballs que han estudiat la relació entre les cèl·lules iNKT i l'autoimmunitat s'han fet amb models animals, principalment en el model de ratolí NOD (Non Obese Diabetic), el qual desenvolupa diabetis de forma espontània de manera semblant de com es dona a humans [28]. Estudis realitzats en ratolins NOD han descrit defectes en la freqüència i funció de cèl·lules iNKT, els quals poden ser corregits per la transferència adoptiva o la sobreexpressió d'un transgènic del TCR invariant i així augmentar la freqüència de cèl·lules iNKT [81]. S'ha observat que ratolins knock out per CD1d^{-/-}, i per tant, ratolins absents de cèl·lules iNKT, desenvolupen més ràpidament T1D que els ratolins wild type, d'una forma més agressiva i severa. La sobrerregulació de l'expressió de CD1d i la transferència adoptiva de cèl·lules CD1d⁺ en aquests ratolins, fa que es recuperi la funció immunoreguladora de les cèl·lules iNKT i que aquestes puguin evitar el desenvolupament de la diabetis [87, 30, 29]. A més a més, l'estimulació de cèl·lules T naive expressant un TCR diabetogènic en presència de cèl·lules iNKT, no fa que es bloquegi l'activació inicial de les cèl·lules T patogèniques, però, tant la seva proliferació com la seva secreció de citocines com la IL-2 o l'IFN γ , queda inhibida. Aquestes dades suggereixen que les cèl·lules iNKT poden evitar o alentir la progressió de T1D prevenint la diferenciació de les cèl·lules Tef a cèl·lules T autoreactives.

Per altre banda, diferents grups van mostrar, que fent varies injeccions amb α GalCer als ratolins NOD, aquests quedaven protegits contra la T1D. Aquesta protecció produïda per l' α GalCer era més efectiva durant la primera etapa del desenvolupament de la diabetis, quan els illots pancreàtics començaven a ser infiltrats [88,89]. Com s'ha dit anteriorment, una de les funcions de les cèl·lules iNKT, es que poden reclutar DCs, per tant, la protecció de les cèl·lules iNKT sembla estar associada amb una inducció i un reclutament de les DC tolerogèniques que poden promouen la generació de cèl·lules Treg i així inhibir la funció de les cèl·lules Tef [90,91] . D'altres estudis on s'analitzaven diferents anàlegs de l' α GalCer, van suggerir que aquests podien també retardar l'aparició de la T1D [92]. Per exemple, l'anàleg OCH, una esfingomielina truncada derivada del α GalCer, mostra avidesa per les cèl·lules iNKT així com una més feble secreció de IFN γ però més forta IL-4 que en resposta al α GalCer [93]. El tractament a llarg termini de ratolins NOD amb OCH també pot preveure la T1D [94].

A humans, degut a la baixa freqüència de cèl·lules iNKT ha estat més complicat el seu estudi. Tot i així, diferents estudis realitzats en humans a diferents etapes del desenvolupament de la T1D, (individus amb un alt risc, en debut i/o diabètics) es va observar una baixa freqüència de cèl·lules iNKT a sang perifèrica així com una funció reduïda i defectes en la producció de citocines [95].

I.6. Cèl·lules Treg

Les cèl·lules Treg són considerades una bona eina per mantenir la tolerància immunològica, la qual és essencial pel bon manteniment i l'estabilitat del sistema immunitari. Generalment són cèl·lules T CD4⁺ restringides per molècules de MHC de classe II.

I.6.1 Fenotip

Existeixen diferents subgrups de cèl·lules Treg, les quals poden actuar en diferents estadis de la resposta immunitària. Aquests diferents subgrups, es caracteritzen per l'expressió de diferents receptors i secreció de citocines. Generalment, són acceptats dos grups de cèl·lules Treg basats en la seva ontogènia:

a) Cèl·lules T reguladores naturals (nTregs): Les cèl·lules T reguladores naturals són cèl·lules T amb propietats reguladores que expressen alts nivells del receptor CD25 (Cadena α del receptor de la IL-2) d'una forma constitutiva. Les cèl·lules Treg CD4⁺CD25⁺⁺ constitueixen entre un 5-10% del total de cèl·lules T CD4⁺ perifèriques a ratolins i humans. Les cèl·lules Treg són d'origen tímic i són seleccionades i activades per interaccions d'alta afinitat amb el TCR [96]. Secreten baixos nivells de IL-2 i tenen la capacitat de suprimir la proliferació de les cèl·lules Tef. Aquesta baixa capacitat de secreció de IL-2 fa que les cèl·lules Treg siguin més dependents d'aquesta citocina pel seu manteniment i la seva homeòstasi. Les cèl·lules Treg expressen constitutivament el factor de transcripció Foxp3 (Forkhead box protein 3) [97] essencial i necessari pel seu correcte desenvolupament i funció [98]. Les cèl·lules Treg també és caracteritzen per la baixa expressió de CD127 (Cadena α del receptor de la IL-7) contràriament a les cèl·lules T naive o memòria, que l'expressen a nivells alts [99]. D'altres marcadors expressats a les cèl·lules Treg són CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), GITR (Glucocorticoid-induced tumour-necrosis-factor-receptor-related protein), CD122, CD62L i CD45RO [100], entre d'altres, tot i que l'expressió de tots aquests marcadors no és exclusiva de cèl·lules Treg.

b) Cèl·lules T reguladores induïdes (iTregs): Són induïdes a perifèria des de cèl·lules T convencionals, CD4⁺Foxp3⁻, en resposta a l'estimulació per part d'un antígen, sota condicions tolerogèniques, a partir de l'estimulació del receptor i la presència del factor de creixement, TGFβ. Un cop induïdes, expressen Foxp3 i adquireixen un fenotip de cèl·lula reguladora de manera transitòria. Aquestes, segons el patró de citocines secretat poden dividir-se en dos grups:

b.1) Les iTregs Tr1: Es caracteritzen per produir grans quantitats de IL-10 i baixos i/o moderats nivells de TGFβ [101].

b.2) Les iTregs Th3: Es caracteritzen per produir preferentment TGF-β [102].

Així, ambdós poblacions, les cèl·lules T reguladores naturals i les induïdes, tenen un precursor comú amb el de les cèl·lules T convencionals, cèl·lules T CD4⁺ que es caracteritzen per presentar alts nivells d'expressió de CD25 (cadena α del receptor de la IL-2) i per la seva capacitat reguladora. Suprimeixen la resposta immune per mecanismes depenent de contacte cel·lular i de factors solubles, així com TGFβ, IL-10 i IL-35 [103,104,105,106,107]. A part de CD25^{high}, CD4 i Foxp3, també expressen diversos marcadors d'expressió constitutiva, així com CD127^{low}, GITR, OX40 (CD134), CD62L, CTLA-4 (CD152) entre d'altres (Fig. 10).

I.6.2 Origen i desenvolupament

La generació de cèl·lules Treg (naturals) amb fenotip CD4⁺CD25⁺⁺ Foxp3⁺ es duu a terme a nivell tímic. L'existència al còrtex tímic de cèl·lules dobles positives (DP) i la interacció d'aquestes amb cèl·lules epitelials corticals (cTEC) i la secreció de citocines com IL-2 i IL-15, fa que les cèl·lules DP passin a la medul·la on adquireixen el coreceptor CD4, l'expressió de CD25 i Foxp3, gràcies a la interacció amb cèl·lules epitelials corticals, cèl·lules dendrítiques convencionals i/o plasmacitoides, així com a la secreció de certes citocines, sortint a perifèria com a cèl·lules nTreg. Per altra banda, les cèl·lules de la medul·la que no adquireixen ni CD25 ni Foxp3 surten a perifèria amb fenotip de cèl·lula T efectora (CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻).

Recentment, s'ha començat a parlar de cèl·lules "single positive" SP CD8⁺ Treg, les quals presenten marcadors associats a cèl·lules Treg, com Foxp3, CD25, CTLA-4 i GITR tot i que els nivells d'expressió són més baixos que a les cèl·lules Treg CD4⁺ [108]. Aquestes cèl·lules SP CD8⁺CD25⁺ Treg, tenen funció supressora, ja que diferents estudis ha demostrat la seva capacitat per suprimir la proliferació de les cèl·lules Tef [109] (Fig. 11).

Les cèl·lules Treg, durant el seu desenvolupament al timus, adquireixen d'altres marcadors de superfície, com CD127^{low}, CD62L, CD103, CD152 (CTLA-4, Citotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) i GITR [1]. Cap d'aquests marcadors és exclusiu de les cèl·lules Treg, fet que dificulta molt el seu aïllament.

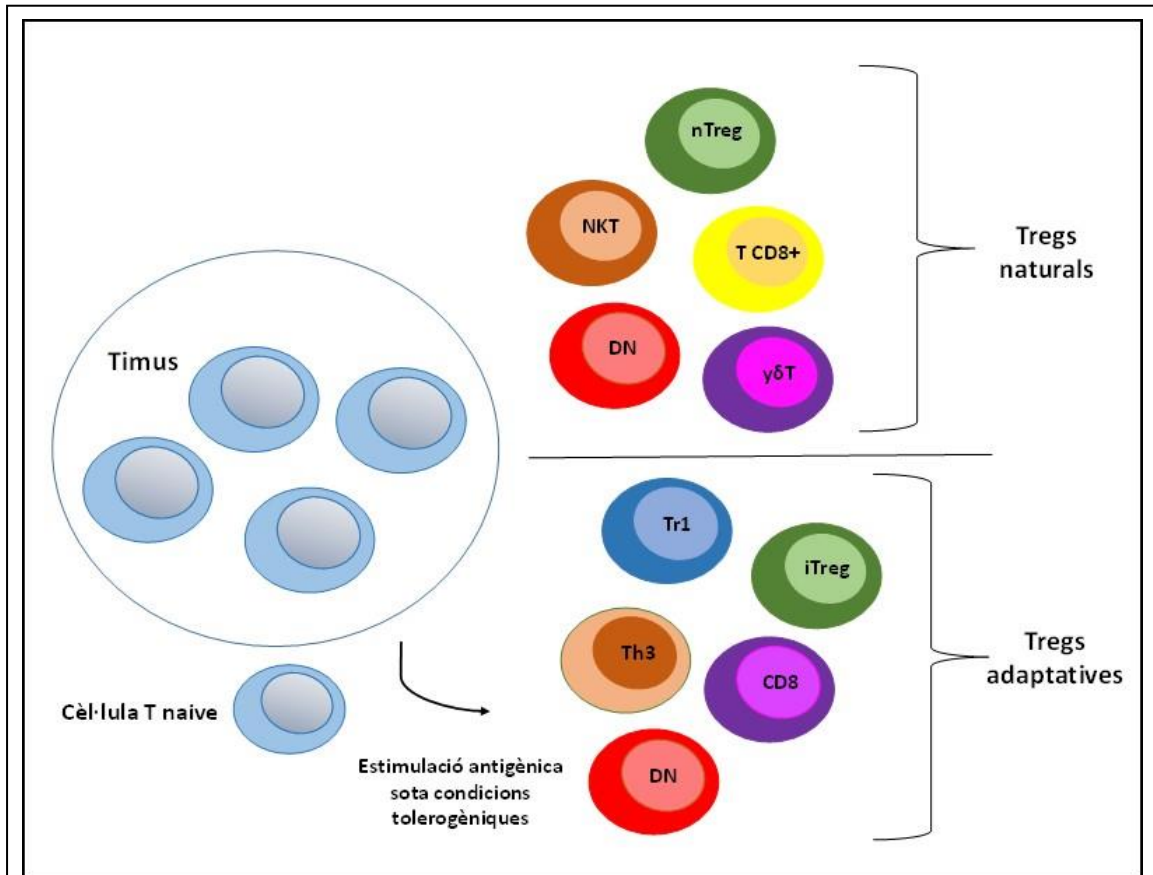


Figura 10. Cèl·lules T reguladores naturals i adaptatives i/o induïdes. Hi ha diferents tipus de cèl·lules T reguladores que es poden classificar en dos grans grups: les cèl·lules Treg naturals d'origen tímic i les cèl·lules Treg adaptatives i/o induïdes a perifèria sota condicions tolerogèniques. (Adaptat de: Shalev I, Schmelzle M, Robson SC, Levy G. Making sense of regulatory T cell suppressive function. *Semin Immunol*, 2011; 23: 282-292).

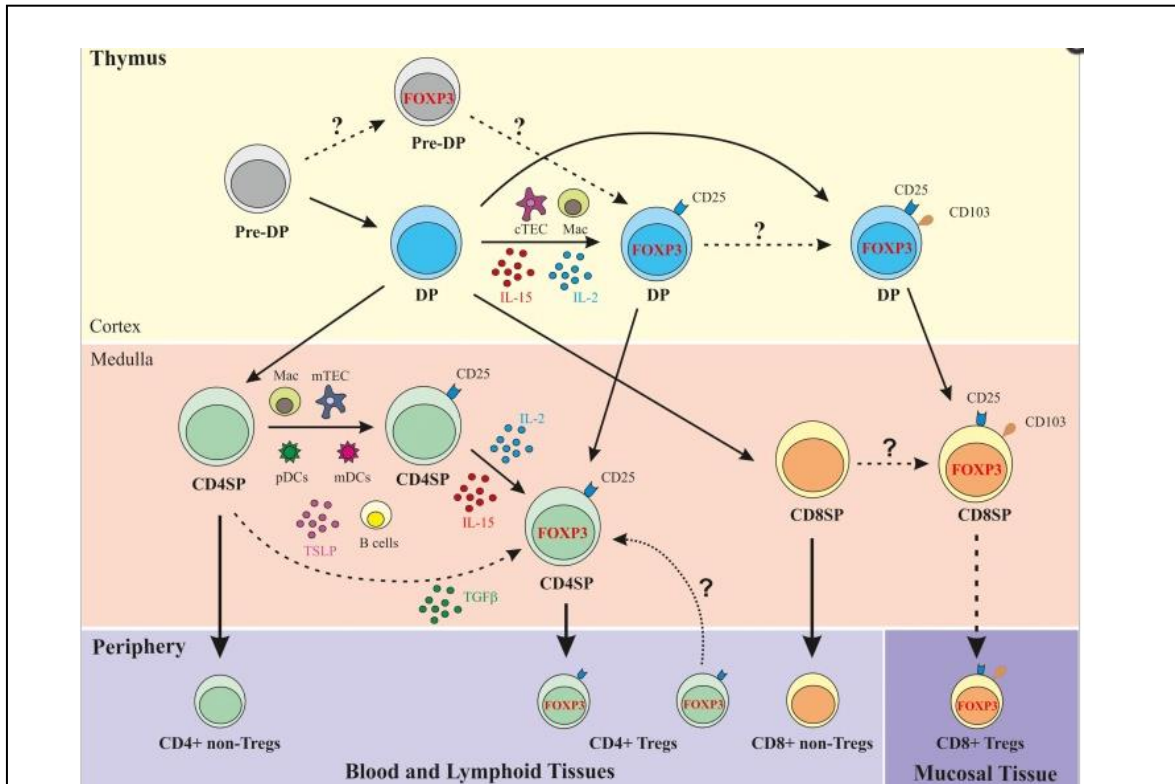


Figura 11. Esquema del desenvolupament de les cèl·lules Treg humanes a timus.

(Caramalho Í, Nunes-Cabaço H, Foxall RB, Sousa AE. Regulatory T cell development in the human thymus. *Front Immunol* 2015; 3; 6:395)

I.6.3 Homeòstasi

Tal i com s'ha explicat anteriorment, les cèl·lules Treg que surten a perifèria des de el timus, són cèl·lules amb un fenotip $CD3^+CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$, que són capaces de reconèixer antígens peptídics presentats en el context de molècules de MHC de classe II. La seva activació, requereix de l'estimulació del TCR i de la presència de IL-2. A part de Foxp3, el qual és un marcador important per la homeòstasi de les cèl·lules Treg [110] diversos experiments han suggerit que el paper de la IL-2 és també important pel seu bon manteniment i funció. Així, experiments realitzats per *Setoguchi R et al. 2005* [111] en ratolins on es bloquejà l'activitat de la citocina IL-2 amb un anticòs bloquejant, es va veure afectada la proliferació i l'activitat de les cèl·lules Treg. L'expressió de molècules co-estimuladores com CD28 semblen ser necessàries per al seu manteniment en perifèria tal i com mostren experiments realitzats per *Tang Q, et al. 2003* [112]. La molècula SP1 (sphingosine 1-phosphate), molècula que promou la sortida de les cèl·lules Treg des del timus, melsa i ganglis a perifèria, també ha estat implicada com a factor important en la homeòstasi de les cèl·lules Treg, així com CD44, que sembla ser important per la seva proliferació [113].

I.6.4 Cèl·lules Treg i autoimmunitat

S'han proposat diversos mecanismes que implicarien a les cèl·lules Treg en el desenvolupament de diferents malalties autoimmunitàries, així com la T1D, l'Artritis Reumatoide, les malalties autoimmunitàries de la tiroide, entre d'altres. La major part dels estudis de les cèl·lules Treg amb autoimmunitat descriuen una baixa freqüència i una reducció de la seva funcionalitat. Els primers estudis realitzats a humans amb autoimmunitat van descriure una disminució de cèl·lules Treg a sang perifèrica. Estudis posteriors, van demostrar que aquesta disminució de cèl·lules Treg a nivell sanguini a individus amb autoimmunitat, fou el resultat d'un reclutament o migració de les cèl·lules Treg al lloc de la inflamació, on el percentatge d'aquestes, estava incrementat respecte a perifèria [95]. Estudis previs, van mostrar que individus on Foxp3 era defectiu o absent, com per exemple en el síndrome IPEX (Polyendocrinopathy enteropathy X linked) els individus presentaven un tipus d'autoimmunitat molt agressiva [114,115].

I.6.4.1 Cèl·lules Treg i T1D

Molts estudis realitzats en ratolins NOD han relacionat les cèl·lules Treg amb la T1D, així, estudis realitzats amb ratolins NOD timectomitzats al voltant de la 3era setmana d'edat, van mostrar una marcada reducció de la població de cèl·lules Treg i un augment de la incidència de T1D. Ratolins NOD knock-out per Foxp3^{-/-}, s'observà un increment en la incidència de T1D comparada amb ratolins NOD wild type [116].

Estudis previs realitzats a humans, van suggerir que la freqüència de cèl·lules Treg a pacients amb T1D a sang perifèrica era més baixa que a individus sans i aquesta era la causa de l'autoimmunitat. Seguidament, es va suggerir que no era qüestió de freqüència, sinó que a individus amb T1D, les cèl·lules Treg tenien una reduïda capacitat supressora comparada amb els individus sans [117]. Estudis més recents, suggereixen que la T1D no és resultat d'una funció supressora deficient de les cèl·lules Treg CD4⁺Foxp3⁺ dels pacients, si no que la causa de la T1D en aquests pacients és deguda a la resistència de les Tef a ser regulades per les cèl·lules Treg autòlogues [118,119].

I.7 Citocines immunomoduladores

Les citocines són mediadors importants de la resposta immunitària, ja que juguen un paper molt important tant a nivell d'immunoregulació com d'estimulació. Segons el patró de citocines secretat, les cèl·lules T es poden classificar en Th1, Th2 i/o Th17. Les cèl·lules Th1 caracteritzades per expressar el factor de transcripció T-Bet, secreten citocines pro-inflamatòries com IL-2, IFN γ i TNF α entre d'altres. Les cèl·lules Th2, expressen Gata-3 i es caracteritzen per la secreció de citocines de caràcter immunoregulador, com IL-4, IL-10, IL-13 i TGF β 1. Més recentment, s'ha començat a parlar de cèl·lules Th17, responsables de la secreció d'IL-17 i caracteritzades per la expressió del factor de transcripció ROR- γ t.

Les citocines immunoreguladores són principalment secretades per cèl·lules T reguladores com les cèl·lules iNKT i les Tregs. Les cèl·lules iNKT produeixen gran quantitats de citocines tant de tipus Th1 com de tipus Th2 (IL-5, GM-CSF, TNF α , IFN γ , IL-10, IL-4, IL-13, IL-21 i IL-17) un cop són activades. A humans, les cèl·lules iNKT-CD4⁺ secreten citocines Th1 i Th2 i les cèl·lules iNKT-CD4⁻ secreten principalment citocines de tipus Th1. En canvi, a ratolins també es troben cèl·lules iNKT CD4⁺ i CD4⁻ però no està ben definit la distinció entre la secreció produïda per unes o per les altres, ja que la majoria dels estudis s'han limitat als estudis de la secreció d'IFN γ i IL-4 [120]. Les cèl·lules Tregs secreten principalment citocines anti-inflamatòries, com IL-10, TGF- β i IL-35, consistents amb la seva funció anti-inflamatòria [121].

El TGF β 1, secretat per cèl·lules Tregs entre d'altres, és ben conegut per la seva funció immunoreguladora ja que pot inhibir l'acció d'altres tipus cel·lulars, així com l'acció de l'IFN γ , TNF α i d'altres citocines pro-inflamatòries [122]. La IL-4, citocina considerada prototip d'una resposta de tipus Th2, té una funció anti-inflamatòria bloquejant la síntesi de diverses citocines pro-inflamatòries. A més a més, participa en la diferenciació de cèl·lules que secreten citocines de tipus Th2 així com en la diferenciació de limfòcits B [121]. La IL-13 està molt estudiada en relació a la inflamació al·lèrgica, tot i que, també té funció reguladora perquè afavoreix la proliferació de limfòcits Th2 que alhora secreten més IL-13. La elevada secreció de citocines tipus Th2 estimula a l'hora, la diferenciació de limfòcits B, producció IgE així com el reclutament de cèl·lules del sistema innat als llocs d'inflamació [123].

Existeixen dos receptors d'IL-13, el receptor de tipus I (IL-13R α 1/IL4R α) i el receptor de tipus II (IL13R α 2). Quan la IL-13 interacciona amb el receptor de tipus I, s'estableix una unió de baixa afinitat amb la cadena IL13R α 1 abans de la seva dimerització amb la cadena IL4R α del receptor. Amb la dimerització es (IL-13R α 1/IL4R α) es produeix la senyalització intracel·lular a través de la fosforilació de STAT6 via Jak quinases (Jak2) [124]. En canvi, el receptor de tipus II (IL13R α 2) es troba en forma de monòmer i la unió d'IL-13 a aquest receptor és d'alta afinitat. La via de senyalització del receptor IL13R α 2 és menys coneguda. Té una citoplasmàtica curta que no té llocs d'unió reconeguts per molècules de senyalització. Per això es creia inicialment que era un com a "decoy receptor" regulant la disponibilitat d'IL-13 que es podia unir a IL13R α 1. Però, estudis recents, han demostrat que el receptor IL13R α 2 emet senyals intracel·lulars mitjançant molècules com STAT3, MAPK, PI3-K i AP-1 [125,126] i per tant pot exercir funcions específiques. D'altres estudis, suggereixen que el receptor IL13R α 2 pot inhibir la senyalització del receptor IL13R α 1 i per tant modificar la resposta a la IL-13 [127,128](Fig. 12).

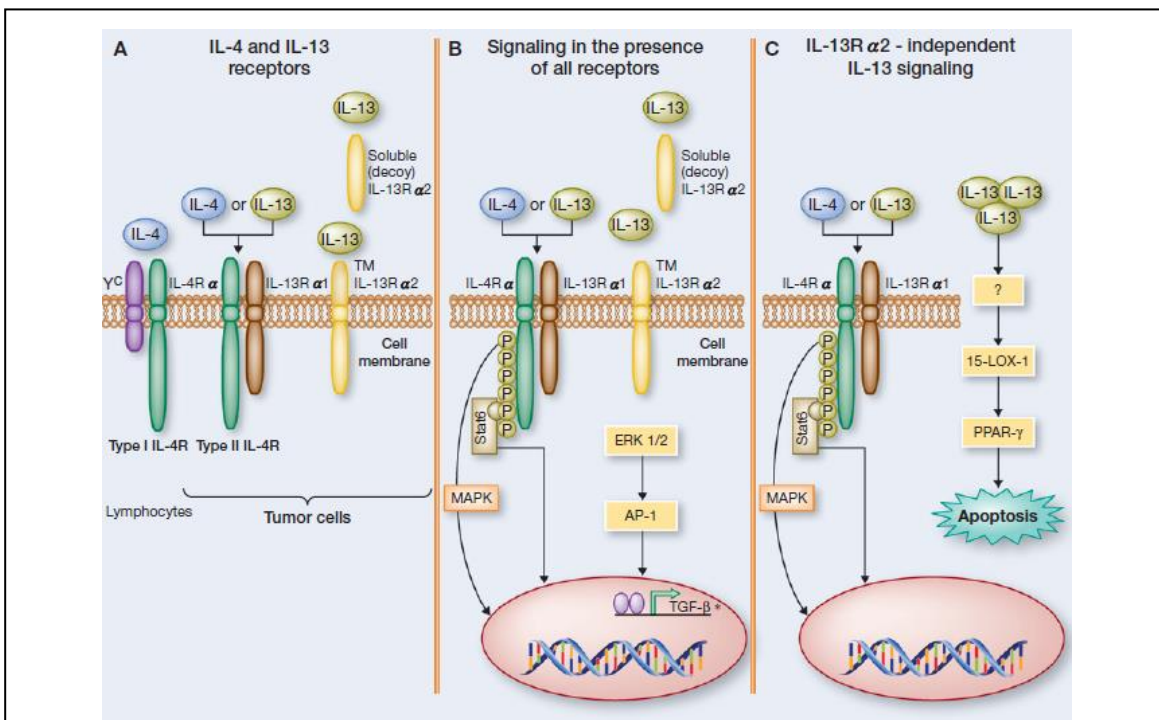


Figura 12. Senyalització pels diferents receptors de IL-13. **A.** Les citocines IL-4 i IL-13 s'uneixen a IL4R de tipus II format per la unió de IL13R α 1 i IL4R α . La IL-13 també pot unir-se a IL13R α 2 amb més alta afinitat que a IL13R α 1 o inclús a IL13R α 2 soluble **B.** Aquesta unió de l'IL-13 al IL4R de tipus II induïx la senyalització per Stat6 via Jak quinases (Jak2) i la seva unió al IL13R α 2 pot potenciar la inducció de l'expressió de l'expressió de TGF- β via senyalització ERK i AP1. **C.** En absència de IL13R α 2, l'IL-13 pot millorar la seva senyalització via IL4R tipus II. (Hallett MA, Venmar KT, Fingleton B. Cytokine Stimulation of Epithelial Cancer Cells: The Similar and Divergent Functions of IL-4 and IL-13. Cancer Research, 2012; 72: 6338-43).

I.8 Immunoteràpia

I.8.1 Cèl·lules iNKT

Tot i que el mecanisme d'acció i modulació de les cèl·lules iNKT és complicat perquè tenen tant funció efectora com reguladora, són considerades una bona diana per la teràpia immunològica contra les malalties autoimmunitàries. Degut a la baixa freqüència de cèl·lules iNKT a humans, la transferència adoptiva es fa molt costosa i complicada, per tant, una alternativa a la transferència adoptiva, és activar-les directament *in vivo* a partir de l'administració de α GalCer. L'activació *in vivo* de les cèl·lules iNKT també té certes limitacions, així com per exemple la via d'administració, ja que s'ha vist que la via intravenosa té un efecte limitant en alguns pacients [129]. Tot i així, degut a la baixa freqüència de cèl·lules iNKT a humans, fa que l'estimulació d'aquestes *in vivo* amb l' α GalCer no sigui tòxica per l'organisme. Contràriament, a ratolins, la freqüència de cèl·lules iNKT és més elevada i per tant, severes injeccions amb α GalCer acaba sent tòxic per l'animal i per tant, ineficient [130]. Un mètode alternatiu a l'administració de l' α GalCer, és injectar directament DCs polsades prèviament amb l' α GalCer. En aquest cas, l'estratègia permet seleccionar els diferents subgrups de cèl·lules iNKT (CD4,CD8,DN) per poder posteriorment, expandir *in vitro* aquelles cèl·lules iNKT pures i del nostre interès, ja que els diferents subgrups de cèl·lules iNKT tenen un patró de citocines i funcions diferents [131]. Amb aquest mètode s'aconsegueix activar tant la resposta innata com la adaptativa [130]. Un dels avantatges d'usar cèl·lules iNKT per la immunoteràpia, és que són cèl·lules restringides per molècules de CD1, les quals no són polimòrfiques i per tant, evita els grans problemes d'histocompatibilitat entre diferents individus.

L'Activació de les cèl·lules iNKT, així com el patró de citocines que poden secretar, ve determinar no només el tipus d'estímul, sinó també per l'estructura del glicolípid i el tipus d'interacció que s'estableix entre TCR-Ag-CD1 [93,132]. Per tant, s'està considerant l'ús de diferents anàlegs de l' α GalCer per immunoteràpia intentant augmentar l'efecte supressor de les cèl·lules iNKT.

I.8.2 Cèl·lules Treg

Diferents estudis han intentat l'ús de les cèl·lules Treg com a mètode d'immunoteràpia contra la T1D. Inicialment, diferents estudis de transferència adoptiva usant cèl·lules Treg autòlogues o derivades d'individus sans es pensada ser una bona estratègia d'immunoteràpia [133]. Així, diversos experiments intentant buscant immunoteràpies usant cèl·lules Treg han estat descrits. Per exemple; (a) cèl·lules Treg expandides *in vitro* en presència de APCs, sembla que tenen més potència que les cèl·lules Treg reactives policlonal, ja que mostren un perfil de seguretat favorable *in vivo* [134,135]; (b) la conversió *ex vivo* de cèl·lules T naive ($CD4^+CD25^-$) a cèl·lules Treg induïdes ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) amb funció supressora, representen una estratègia alternativa a l'expansió i aïllament *ex vivo* de les Treg naturals [136]. (c) Marek. Trzonkowska et al. 2012, van publicar un estudi on es demostrava que la infusió de cèl·lules Treg amb fenotip $CD4^+CD25^{high}CD127^-$ preservaven la funció de les cèl·lules β i amb això, s'aconseguia retardar el debut de la T1D en nens [137] i (d) estudis realitzats en ratolins on s'injectà directament el complex format per IL-2/anti-IL2 (citocina + anticòs monoclonal anti-IL2) va augmentar l'expansió de les cèl·lules Treg *in vivo* 10 vegades respecte del normal [138]. Tots aquests mètodes d'augmentar el número de cèl·lules iNKT tenen certs problemes a l'hora de fer-les servir. El primer problema, és que les cèl·lules Treg estan restringides per molècules de MHC, les quals són molt polimòrfiques i aquest fet, pot portar greus problemes d'histocompatibilitat entre diferents individus. Un altre inconvenient, és que les cèl·lules Treg $Foxp3^+$ que han estat expandides *in vitro* poden perdre la seva expressió de $Foxp3$ i expressar un fenotip de cèl·lula T convencional, arribant fins i tot, a ser patogèniques [139]. Degut als diferents mecanismes d'acció de les cèl·lules Treg és difícil saber quin mecanisme pot regular en una malaltia determinada en un ambient inflamatori on hi ha una gran diversitat de citocines que podrien estar implicades [140,141].

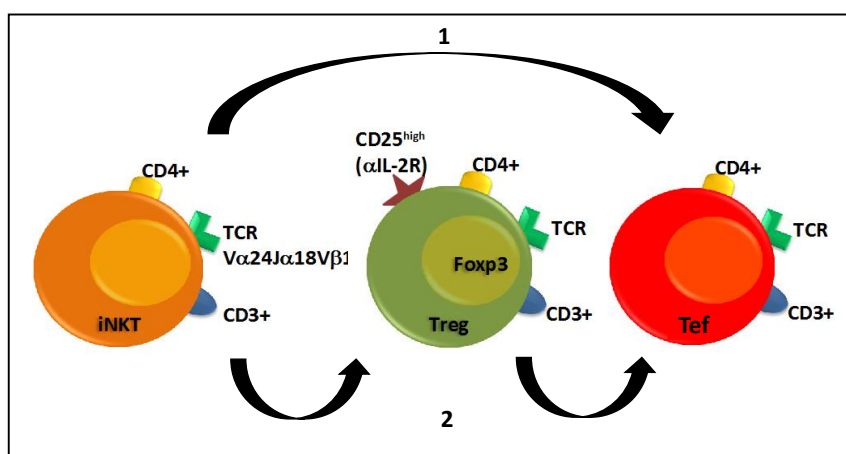
Hipòtesi i Objectius

Consideracions prèvies

La T1D es conseqüència de la destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques productores d'insulina, degut principalment a cèl·lules T autoreactives i autoanticossos. A la T1D la resposta autoimmune comença molt abans del debut clínic de la malaltia i per tant, es fa molt difícil evitar la seva progressió. La limitació en l'obtenció de mostres de pacients en diferents estadis del desenvolupament, dificulta i limita molt el seu estudi. El nostre grup va tenir accés a mostres de pàncrees humà, no només teixit total (endocrí i exocrí), sinó també mostres d'illots pancreàtics purificats. Tot i que la funció més coneguda de les cèl·lules iNKT és la seva funció efectora contra patògens, també han estat considerades cèl·lules immunoreguladores per la seva capacitat de secretar grans quantitats de citocines, així com per la seva capacitat de modulació de la funció d'altres tipus cel·lulars. També són cèl·lules reguladores, aquestes ben caracteritzades, les cèl·lules Tregs, de les quals s'ha demostrat que suprimeixen la proliferació de cèl·lules T autoreactives. Tant en humans com en models experimentals, s'ha relacionat una baixa freqüència i defectes funcionals d'aquestes cèl·lules amb el desenvolupament de la T1D.

Hipòtesi

La hipòtesi del treball plantejada, és que les cèl·lules iNKT tenen capacitat supressora, ja sigui, actuant directament sobre la proliferació de les cèl·lules T efectores i/o col·laborant amb les cèl·lules Treg per potenciar la regulació de les cèl·lules T autoreactives. La interacció d'ambdós tipus cel·lulars, es dona *in situ* a l'òrgan diana de la resposta autoimmunitària controlant el desenvolupament de la diabetis tipus 1 humana.



Objectiu general

L'objectiu general d'aquesta tesi doctoral, és determinar si les cèl·lules iNKT tenen capacitat per inhibir l'activació i/o funció de les cèl·lules T autoreactives i per tant, prevenir el desenvolupament de la diabetis tipus 1 humana.

Objectius concrets

- 1) Estudi de la funció reguladora de les cèl·lules iNKT humanes. Comparació de la seva capacitat supressora a controls i pacients amb diabetis tipus 1.
- 2) Determinació del/s mecanisme/s moleculars i/o cel·lulars implicats en la regulació per cèl·lules iNKTs. Factors solubles i/o interacció cèl·lula a cèl·lula.
- 3) Estudi de la col·laboració entre cèl·lules iNKT i T reguladores per a potenciar la regulació de les cèl·lules T autoreactives a la diabetis tipus 1.
- 4) Anàlisi de la presència i la localització anatòmica de les cèl·lules iNKT i Tregs funcionals a l'òrgan diana de la resposta autoimmunitària.

Materials & Mètodes

Material & Mètodes

M&M. 1. Mostres

1.1 Mostres de teixit pancreàtic

1.1.1 Mostres humanes

El teixit pancreàtic humà es va obtenir des d'un pacient amb T1D (Cas 1) [142], una noia de 19 anys que va morir 5 dies després de que li diagnosticuessin T1D. Com a control (Control 7), es va utilitzar una fracció d'illots purificats a partir d'un donant d'òrgans de 19 anys d'edat, que va morir d'un traumatisme al cap i les seves anàlisis d'autoanticossos contra illots va donar negatiu [143].

Tots els protocols van ser aprovats pel Comitè d'Ètica de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, de conformitat amb la Declaració d'Hèlsinki. Les mostres de teixit es van digerir enzimàticament per obtenir una fracció de teixit total (TT) que conté tant part exocrina com endocrina del pàncrees i una fracció d'illots purificats (ILL) que es van seleccionar manualment sota un microscopi estereoscòpic com es descriu a Somoza et al. 1994 [142] amb una puresa de >90%. Les mostres van ser criopreservades o mantingudes en forma de grànuls secs fins al seu ús. Una mostra de teixit de la melsa (M) també es va obtenir a partir del pacient del Cas 1, es va tallar en cubs petits (0,5 cm³) i es van congelar (Taula. 1).

Taula 1. Mostres pancreàtiques humanes

| Etapa T1D | Nom Mostra | Composició de la Mostra |
|---------------|-------------|---|
| Debut (Cas 1) | PB100 (TT) | Teixit Total; conté la part exocrina i la endocrina del pàncrees (Illots de Langerhans) |
| | PB100 (ILL) | Fracció purificada dels illots pancreàtics |
| | PB100 (M) | Melsa; Teixit total |
| Control | PB121 (ILL) | Fracció purificada dels illots pancreàtics d'un individu sà. |

Altres mostres de teixit pancreàtic van ser obtingudes a partir de Network of Pancreatic Organ Donors (nPOD) (www.idrfnpod.org) of the Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF). Les mostres inclouen blocs de teixit congelats del cap del pàncrees de donants sans (casos PanH#6098 (17 anys d'edat), PanH#6112 (6 anys d'edat), del debut de la T1D (cas PanH#6113 (1 setmana d'evolució)) i de pacients amb T1D de llarg termini (PanH#6046, 8 anys d'evolució) que abasten diferents etapes de desenvolupament de la T1D.

1.1.2 Seccions de teixit pancreàtic de ratolins NOD

Les mostres de teixit pancreàtic de ratolins NOD van ser proporcionades pel Dr. Joan Verdaguer de la Universitat de Lleida, Espanya. Els ratolins es van obtenir del Laboratori Jackson (Bar Harbor, EM), es van mantenir a l'Hospital Germans Trias i Pujol a una instal·lació per a animals en condicions lliures de patògens específics en un cicle de llum-fosc de 12 hores amb accés lliure a una dieta estàndard. Les Directrius per a l'Ús i Cura d'Animals del Laboratori de la Generalitat de Catalunya van ser seguits i estudis amb animals van ser aprovats per la Junta de Revisió de l'Hospital. Les mostres utilitzades foren mostres de ratolins NOD en diferents estadis del desenvolupament de la T1D:

- **Ratolins NOD Pre-diabètics:** Ratolins de 9 setmanes (J8-718 i J8-717)
- **Ratolins NOD al debut:** Ratolins de 14 setmanes (J8-547 i J8-640)
- **Ratolins NOD Diabètics:** Ratolins de 20 setmanes (J7-425 i J7-426)

1.2 Mostres de Sang Perifèrica

Les cèl·lules Tef, Tregs i iNKTs van ser purificades des de PBMCs de donants sans (n=14) d'edats entre 20-50 anys i de pacients amb T1D al debut (n=18) (Taula. 2). Es va extreure sang dels pacients amb l'inici de la malaltia clínica, abans de rebre qualsevol tractament. Les mostres de sang heparinitzada van ser preses després de la signatura d'un consentiment informat aprovat pel comitè d'ètica de les institucions pertinents.

Taula 2. Dades pacients T1D. Número de pacients, edat, sexe i autoanticossos

| Grup | n | Edat | Sexe | | Autoanticossos | | | |
|------|----|-------|------|---|----------------|-----|----------|-----|
| | | | M | F | GAD | | Insulina | |
| | | | | | nd | pos | nd | pos |
| T1D | 18 | 17-42 | 14 | 4 | 3 | 15 | 14 | 4 |

M&M. 2. Tècniques moleculars

2.1 Extracció DNA genòmic

Per determinar el tipatge d'HLA de les mostres de pacients amb T1D utilitzades, es va extreure el DNA genòmic a partir de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs) separades i obtingudes a partir d'un gradient de densitat (Ficoll).

Les cèl·lules obtingudes s'incubaren durant 1h a 56°C o a 37°C o/n amb la solució d'extracció de DNA (0,1 M NaCl, 0,01 M TrisHCl, 0,025 M EDTA, 0,5%SDS) on s'hi afegia a l'últim moment, la proteïnasa K (50 µg/ml, 12 U/mg). A continuació es va afegir el mateix volum de fenol/cloroform/isoamil-alcohol (24:25:1) i es barrejà per inversió durant aproximadament 5' i centrifugant a 600xg 10'. Seguidament es va transferir la fase aquosa a un tub nét i es va afegir un volum de cloroform:isomil-alcohol (24:1), barrejant 5' per inversió i centrifugant a 600xg durant 10' a temperatura ambient (TA). Tal i com es va fer prèviament, es va transferir la fase aquosa a un tub nét. El pas següent va ser la precipitació del DNA: es va afegir un 10% del volum d'acetat sòdic (3M) i un volum d'isopropanol i es barrejà per inversió. En aquest punt, s'observà una xarxa blanca de DNA, que es va agafar i es va transferir a un tub nét amb l'ajuda d'una punta prima de pipeta. Un cop obtingut el DNA, es van fer dos rentats usant etanol al 70% i després de l'últim es deixà assecar. Un cop el pellet de DNA estava sec, aquest es va dissoldre en TE pH=8 o aigua i es va mesurar la concentració obtinguda abans de portar-lo a tipar al Banc de Sang i Teixit de Barcelona.

2.2 Extracció de l'RNA i mesura de la seva integritat

2.2.1 Extracció d'RNA

L'extracció d'RNA de les diferents mostres analitzades es va fer seguint el protocol d'extracció del kit "RNeasy Plus Mini kit" de QUIAGEN. Per llisar les cèl·lules es va afegir un volum apropiat de Buffer RLT plus barrejat amb β-Mercapteptanol homogeneïtzant la mostra adequadament amb l'ajuda d'una xeringa, per ajudar a llisar les cèl·lules. Les mostres llisades i homogeneïtzades van ser transferides a una columna d'eliminació de DNA (gDNA eliminator) i centrifugades durant 30s a >8000 x g. Seguidament, es va descartar la columna guardant el sobrenedant al qual es va afegir un volum d'etanol al 70% i es va transferir a una nova columna (RNeasy spin) centrifugant durant 15s a > 8000 x g. Es va descartar el sobrenedant obtingut després de la centrifugació i es va afegir el buffer RW1, el qual ens permetria rentar de forma més severa possibles restes

de carbohidrats, àcids grassos i proteïnes, entre d'altres restes que podrien induir a una dolenta extracció de l'RNA. Es va centrifugar durant 15s a $>8000 \times g$ i es va descartar el sobrenedant. Seguidament, es va afegir a la mostra el buffer RPE, el qual servia per acabar de rentar la mostra de RNA retinguda a la columna. A continuació, es va centrifugar 2' a $>8000 \times g$ i es va descartar el sobrenedant. Es va fer una centrifugació posant la columna en un tub nou de 1,5ml per acabar d'assecar les possibles restes d'etanol que poguessin quedar i que podrien fer malbé la mostra a l'hora d'analitzar. Finalment, es van afegir uns 10-20 μl d'aigua lliure de RNases per eluir l'RNA i seguidament es va portar a quantificar, usant el Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

Determinar l'integritat de l'RNA és un dels passos crítics en l'anàlisi d'expressió de gens. Per tant, un cop obtingut l'RNA de les mostres a estudiar, es va mesurar la integritat de l'RNA usant Agilent 2100 bionalyzer and RNA LabChip (Agilent Technologies). Les mostres amb un RIN > 7 van ser les considerades pels experiments.

2.2.2 Retrotranscripció: Síntesi de cDNA

El cDNA va ser sintetitzat des de l'RNA total obtingut. La retrotranscripció es va dur a terme en dos passos en un volum final de 20 μl ; (a) en un primer pas es va incubar l'RNA (2 μg) amb oligo(dT)₁₅ (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), d'NTPs (10 mM) i aigua tractada amb diethylpyrocarbonate (H₂O DEPC) fins a un volum de 13 μl . Amb això es va fer el pre-shock a 65°C durant 5' seguit de 1' a 4°C. (b) Es va fer una mix amb els següents reactius; Tampó 5x (250 mM Tris-HCL (pH 8.3 a TA), 375 mM KCL, 15 mM MgCl₂) de Invitrogen, 0,1M de DTT (Invitrogen), 40U/ μl de RNase OUT (Invitrogen) i la SuperScript III (200 U/ μl) (Invitrogen). Aquesta mix es va afegir a la barreja del primer pas (a) i la reacció es va incubar durant 1h a 55°C, seguit de 15' a 70°C i 4°C durant 15'.

2.3 Reacció en cadena de la Polimerasa (PCR)

2.3.1 Determinació dels paràmetres de temperatura i MgCl₂ per la qPCR

Per determinar els diferents paràmetres i les condicions que feien falta per les diferents qPCR realitzades, es va fer per a cada parell de primers utilitzats (CD3 γ , GAPDH, Foxp3, V α 24-C α i V α 24-J α 18) un gradient de temperatura (entre 55°C-72°C) usant el termociclador "Mycler Thermal Cycler" (Biorad). El producte de cada qPCR es va córrer en un gel d'agarosa al 2% i es va determinar quina era la temperatura adequada per cada parell de primers. Un cop determinada la temperatura "d'annealing" de cada parell de primers, es van dur a terme una qPCR fent servir diferents concentracions de MgCl₂ (2 mM, 2,5 mM, 3 mM, 3,5 mM i 4 mM) per veure quina concentració era l'adequada

per obtenir millor especificitat a l'hora d'amplificar amb cada parell d'oligonucleòtids (Fig. 1).

Per cada amplímer (CD3 γ , GAPDH, Foxp3, V α 24-C α i V α 24-J α 18) es va fer una corba patró o Standard (STD) amb diferents concentracions, seguint el protocol següent; 1) Fer una PCR convencional per cada parell de primers utilitzant cDNA de PBMCs d'individus sans; 2) córrer el producte de cada PCR en un gel d'agarosa al 2%; 3) tallar la banda corresponent a cada amplímer, purificar-la amb el kit "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" (Promega) i quantificar la concentració d'amplímer obtinguda fent servir un espectrofotòmetre (*BioPhotometer de Eppendorf*), a partir dels valors d'absorbància de 260 i 280 nm. Finalment, 5) fer les dilucions corresponent de la recta patró i realitzar una qPCR per comprovar la seva eficiència. La qPCR es va fer usant el Termociclador Lightcycler 2.0 de Roche Applied Science en capil·lars de 20 μ l. L'anàlisi de les dades obtingudes es va fer usant el programa *LightCycler Software 4.0* (Roche).

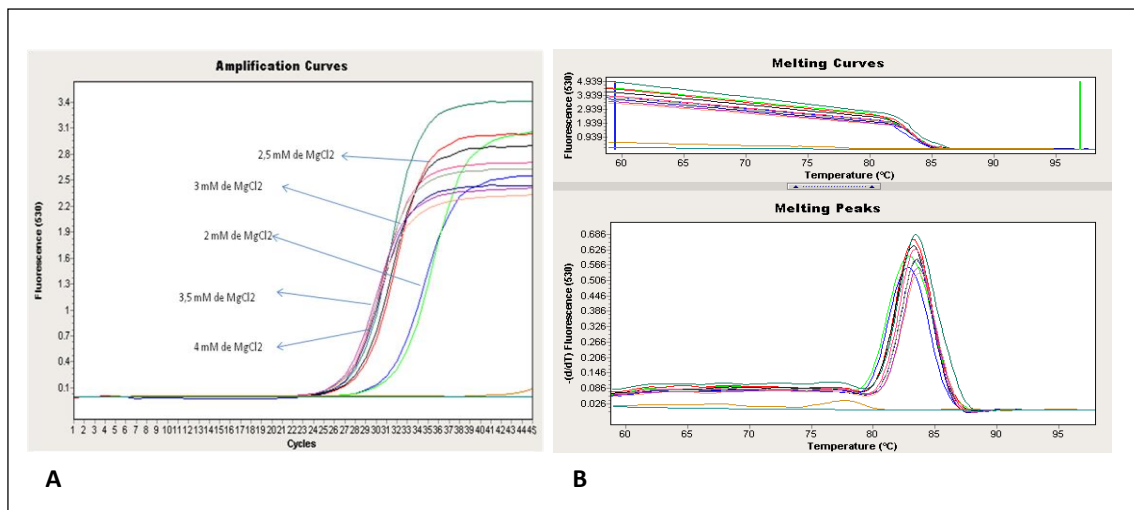


Figura 1. Determinació de les condicions adequades de MgCl₂ per la qPCR: A) Corbes d'amplificació per qPCR realitzades usant diferents concentracions de MgCl₂ per posar a punt l'amplificació de CD3 γ . B) Corbes i pics de "melting" de l'amplificació per CD3 γ del mateix experiment.

2.4 PCR quantitativa (pPCR)

2.4.1 Quantificació de l'expressió de CD3 γ i GAPDH

L'expressió de CD3 γ es va quantificar per qPCR usant primers específics i va ser normalitzada amb l'amplificació en paral·lel de la Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa, GAPDH (*Sigma Aldrich Home*) obtenint el quocient [CD3 γ /GAPDH] per analitzar el número de cèl·lules T totals a les mostres de teixit (TT, ILL, M) de pacients amb T1D i a la mostra control (ILL) (seqüència primers Taula. 4). El número de còpies de CD3 γ i

GAPDH es va quantificar en base a les concentracions d'una corba patró estàndard realitzada amb un banc de dilucions de concentracions conegudes d'amplímer de CD3 γ i GAPDH.

La qPCR es va fer usant la SYBR Green master mix (*LightCycler "Fast Start DNA Master SYBRGreen I kit, Roche Applied Science*) en un volum final de 10 μ l seguint el protocol d'amplificació de la **Taula 3**. El programa d'amplificació per a CD3 γ fou el següent: 45 cicles amb una desnaturalització a 95°C durant 5", un annealing a 61°C durant 5" i una extensió a 72°C 10" amb una fase de melting a 61°C de 15". L'amplificació de GAPDH van ser 40 cicles amb un pas de desnaturalització a 94°C 15", un annealing a 63°C 10" i una extensió a 72°C, fent una fase de melting a 68°C 15".

2.5.2 Quantificació de l'expressió del TCR V α 24J α 18

Les cèl·lules iNKT a teixit es van quantificar a través de dos rondes de qPCR. En un primer pas es va quantificar l'expressió de V α 24/C α fent servir primers específics per V α 24 (*Sigma Aldrich Home*) i per C α (*Sigma Aldrich Home*) (**Taula. 3**) la seqüència dels quals fou descrita prèviament [143]. El número de còpies va ser quantificat en base a una corba estàndard feta a partir d'un amplímer prèviament quantificat. La reacció d'amplificació de V α 24/C α de les mostres de pàncrees es va dur a terme en un volum final de 10 μ l usant les condicions descrites a la **Taula 4**. El programa d'amplificació usat va ser de 55 cicles consistents en una desnaturalització a 95°C durant 5", un annealing a 72°C durant 5" i un pas d'extensió a 72°C durant 10" amb un cicle de melting a 72°C durant 15".

El producte obtingut de la qPCR V α 24/C α es va purificar usant el kit "*Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*" de *Promega*. Molt breument, el protocol a seguir fou el següent: es va afegir un volum equivalent de *Membrane Binding Solution* a la reacció de PCR, es va transferir a una mini columna i es va centrifugar a 16.000xg durant 1' descartant el producte eluït. Seguidament, per fer els rentats, es van afegir 700 μ l de *Membrane Wash Solution* i es va centrifugar a 16.000xg durant 1' descartant el eluït i tornant a repetir el pas anterior però en aquest cas usant 500 μ l de *Membrane Wash Solution* i centrifugant 16.000xg durant 5' tornant a descartar el eluït i tornant a centrifugar durant 1' per eliminar les possible restes d'etanol que haguessin pogut quedar. Per últim, es va transferir la mini columna a un eppendorf de 1,5 ml i s'hi van afegir 20 μ l de *Nuclease-Free Water* incubant durant 1' a temperatura ambient i es va centrifugar a 16.000g durant 1' obtenint el producte purificat.

El producte purificat de V α 24/C α es va reamplificar per qPCR amb primers específics per V α 24 i J α 18 (*Sigma Aldrich Home*). Per l'amplificació de V α 24J α 18 es van usat les condicions descrites a la **Taula 3**. El programa d'amplificació en aquest cas fou de 45

cicles d'amplificació amb desnaturalització a 95°C 5", un annealing a 61°C 5" i un pas d'extensió a 72°C durant 10" seguit d'un pas de melting a 61°C 15".

2.4.2.1 Quantificació de les cèl·lules iNKT

La freqüència de cèl·lules iNKT va ser quantificada seguint el càlcul següent:

$$\frac{[(V\alpha 24/J\alpha 18)] / [(V\alpha 24/C\alpha E)]}{[(CD3\gamma / GAPDH)]}$$

2.4.3 Quantificació de l'expressió de Foxp3

La quantificació de les cèl·lules Treg es va basar en l'expressió del factor de transcripció Foxp3. Es van utilitzar primers específics per Foxp3, la seqüència dels quals fou descrita prèviament [144] (Taula. 3). La barreja de reactius per l'amplificació en un volum final de 10 µl va ser el següent: SYBR Green master Mix, primer Foxp3 5' (5µM), primer Foxp3 3' (5µM), H₂O i MgCl₂ (25 mM). El programa d'amplificació va ser de 45 cicles d'amplificació amb desnaturalització a 95°C 5", un annealing a 66°C 5" i un pas d'extensió a 72°C durant 10" seguit d'un pas de melting a 72°C 15".

2.4.3.1 Quantificació de les cèl·lules Treg

La freqüència de cèl·lules Treg va ser quantificada seguint el càlcul següent:

$$\frac{[(Foxp3)]}{[(CD3\gamma / GAPDH)]}$$

| Condicions finals qPCR per mostres pàncrees (Cas 1) | | | | | |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Vf = 10 µl | CD3γ | GAPDH | Vα24JCaE | Vα24Jα18 | Foxp3 |
| Buffer 10x | 1x | 1x | 1x | 1x | 1x |
| dNTP's 2,5 µM | 0,25 µM | 0,25 µM | 0,25 µM | 0,25 µM | 0,25 µM |
| Primer Fw (5 µM) | 0,5 µM | 0,5 µM | 0,5 µM | 0,5 µM | 0,5 µM |
| Primer Rv (5 µM) | 0,5 µM | 0,5 µM | 0,5 µM | 0,5 µM | 0,5 µM |
| MgCl ₂ (25 mM) | 3,5 mM | 3,5 mM | 3 mM | 4 mM | 4 mM |
| Taq Polimerasa (1U/µl) | 0,04 U/µL | 0,04 U/µL | 0,04 U/µL | 0,04 U/µL | 0,04 U/µL |

Taula 3. Condicions finals per la qPCR a mostres de pàncrees del Cas 1.

| Primer | Seqüència | T ^a annealing |
|---------------|---------------------------------------|--------------------------|
| CD3 γ | Fw: 5'CCCAATGACCAGCTCTACCA 3' | 61°C |
| | Rev: 5'GGAAGTGAATAGGAGGAGAACAC 3' | |
| GAPDH | Fw: (33 s) 5'CTTCCTTTGCGTCGCCAG 3' | 63°C |
| | Rev: (405 as) 5' AGCCCCAGCCTTCTCCA 3' | |
| Foxp3 | Fw: 5' TCAAGCACTGCCAGGCG 3' | 66 °C |
| | Rev: 5' CAGGAGCCCTTGTCGGAT 3' | |
| V α 24 | 5' CTGGATGCAGAACAAAGCAGAGC 3' | 72°C i 61°C * |
| C α | 5' GTTGCTAGGCCGCGGCACTGTT 3' | 72°C |
| J α 18 | 5' AGCCAGACAGTCAACTGAGTTCC 3' | 61°C |

Taula 4. Taula oligonucleòtids: Seqüències corresponents als oligonucleòtids específics emprats per a la quantificació de CD3 γ , GAPDH, Foxp3, V α 24, C α i J α 18, amb la seva corresponent T^a d'annealing. El signe (*) indica que la T^a d'annealing varia segons el segment amplificat, V α 24C α a 72°C; V α 24J α 18 a 61°C.

2.5 PCR Convencional

2.5.1 Amplificació de HPRT, Insulina , PPY i PNLIP

Blocs de teixit pancreàtic congelat de l'nPOD (M&M. 1) es van tallar a rodanxes de 10 μ m, es van pesar i quantitats iguals de material es van utilitzar per fer l'extracció d'RNA, retrotranscripció i anàlisi per PCR convencional. L'expressió de CD3 γ (Taula. 3 i 4), insulina, polipèptid pancreàtic (PPY), lipasa pancreàtica (PNLIP) i un gen de manteniment (HPRT) es van usar per comprovar l'estadi de la malaltia del teixit pancreàtic, usant encebadors específics descrits prèviament (Taula. 5).

La barreja de reactius en tots els casos per l'amplificació es va fer en un volum final de 15 μ l va ser seguint les condicions descrites a la Taula. 6. El programa d'amplificació va ser el següent en tots els casos: 45 cicles d'amplificació amb una desnaturalització a 95°C 30", un annealing a 57°C 30" i una extensió a 72°C durant 30", amb una extensió final a 57°C 5'.

| Primer | Sequence | T ^a annealing |
|----------|----------------------------------|--------------------------|
| HPRT | Fw: 5'-TGACACTGGCAAACAATGCA-3' | 57 °C |
| | Rv: 5'-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3' | |
| PPY | Fw: 5'-TGCCCAGGGAGCCCCACTG-3' | 57 °C |
| | Rv: 5'-CTAGGCCTGGTCAGCATGTTGA-3' | |
| PNLIP | Fw: 5'-GAGCAGTAGCAGGAAAAGAAGT-3' | 57 °C |
| | Rv: 5'-TTAGTATATAGGAGGAAGCGGG-3' | |
| INSULINA | Fw: 5'-AAGCGTGGCATTGTGGAAC-3' | 57 °C |
| | Rv: 5'-CAAGGGCTTTATTCCATCTCTC-3' | |

Taula 5. Taula oligonucleòtids: Seqüències corresponents als oligonucleòtids específics emprats per l'amplificació de l'HPRT, INS, PPY i PNLIP amb la corresponent T^a d'annealing.

2.5.1.1 Quantificació de HPRT, Insulina, PPY i PNLIP

La quantificació dels nivells d'insulina, PPY i PNLIP es van calcular de la manera següent:

| | | |
|-------------------------------|--------------------------|----------------------------|
| [INSULINA] ----- [HPRT] | [PPY] ----- [HPRT] | [PNLIP] ----- [HPRT] |
|-------------------------------|--------------------------|----------------------------|

2.5.2 Amplificació de V α 24J α 18

Els primers per a la quantificació de les cèl·lules iNKT van ser els mateixos esmentats anteriorment (Taula. 3). En aquest cas, també es van fer dos tandes d'amplificació, una per l'amplificació de V α 24C α i una altra per V α 24J α 18 seguint les condicions descrites a la Taula. 6. El programa d'amplificació per V α 24C α va ser de 45 cicles d'amplificació amb un pas de desnaturalització a 95°C 1', un d'annealing a 65°C 1' i d'extensió a 72°C durant 1', amb una extensió final a 72°C 10'. El producte purificat de V α 24C α es va reamplificar amb primers específics per V α 24 i J α 18. El programa d'amplificació en aquest cas va ser de 40 cicles d'amplificació amb una desnaturalització a 95°C 30", un annealing a 61°C 30" i una extensió a 72°C durant 30", amb una extensió final a 72°C 5'.

A més de l'expressió de la cadena α del TCR invariant corresponent a les cèl·lules iNKT, també es va reamplificar V β 11, cadena β preferentment associada a les iNKTs humanes. Per a la seva reamplificació es van usar primers específics per (Fw: 5'-ACAGTCTCCAGAATAAGGACG-3') i per la cadena constant, C β (Rv: 5'-CTTCTGATGGCTCAAACA-3') (Taula. 6). El programa d'amplificació van ser 35 cicles d'amplificació amb una desnaturalització a 95°C 30", annealing a 55°C 30" i extensió a 72°C durant 1', amb una extensió final a 72°C 10'.

2.5.2.1 Quantificació de cèl·lules iNKT

La freqüència de cèl·lules iNKT va ser quantificada seguint el càlcul següent:

$$\frac{[(V\alpha24/J\alpha18)/(V\alpha24/C\alpha E)]}{[(CD3\gamma/GAPDH)]}$$

2.5.3 Amplificació de l'expressió de Foxp3

Els primers per a la quantificació de les cèl·lules Treg van ser els mateixos esmentats anteriorment a la [Taula. 4](#). El programa d'amplificació utilitzat va ser de 35 cicles d'amplificació amb; desnaturalització a 95°C 30", annealing a 58°C 30" i extensió a 72°C durant 30", amb una extensió final a 72°C 7', ([Taula. 6](#)).

2.5.3.1 Quantificació de cèl·lules Treg

La freqüència de cèl·lules Treg va ser quantificada seguint el càlcul següent:

$$\frac{[(Foxp3)]}{[(CD3\gamma/GAPDH)]}$$

2.5.4 Amplificació de l'expressió d'IL-13, IL13R α 1 i IL13R α 2

Per a la quantificació dels receptors d'IL-13 (IL13R α 1 i IL13R α 2) així com per l'amplificació de la pròpia IL-13, es van usar primers específics ([Taula. 7](#)). En tots els casos, la mix per a l'amplificació va tal i com s'explica a la [Taula. 6](#). El programa d'amplificació usat va ser de 38 cicles d'amplificació amb; desnaturalització a 95°C 30", annealing a 59°C per IL13R α 1 i a 57°C per IL13R α 2 i l'IL-13 durant 30" i extensió a 72°C 30", amb una extensió final de 72°C 5'. Per la normalització de les dades es va fer servir el quocient [CD3 γ /HPRT].

| Condicions finals PCR convencional | | | | |
|---|--------------------------------|--------------|-------------|-----------------------------------|
| Vf = 15 µl | HPRT/INS/ PPY/PNLIP | Foxp3 | CD3γ | IL-13/IL13Rα1/ IL13Rα2 |
| Buffer 10x | 1x | 1x | 1x | 1x |
| dNTP's 2,5 µM | 0,25 µM | 0,25 µM | 0,25 µM | 0,25 µM |
| Primer Fw (5 µM) | 0,5 µM | 0,25 µM | 0,5 µM | 0,5 µM |
| Primer Rv (5 µM) | 0,5 µM | 0,5 µM | 0,5 µM | 0,5 µM |
| MgCl₂ (25 mM) | 2 mM | 2 mM | 2 mM | 2 mM |
| Taq Polimerasa (1U/µl) | 0,026 U/µL | 0,026 U/µL | 0,026 U/µL | 0,026 U/µL |

| Vf = 15 µl | Vα24JCaE | Vα24Ja18 | Vβ11 |
|---------------------------------|-----------------|-----------------|-------------|
| Buffer 10x | 1x | 1x | 1x |
| dNTP's 2,5 µM | 0,25 µM | 0,25 µM | 0,25 µM |
| Primer Fw (5 µM) | 1 µM | 0,5 µM | 0,4 µM |
| Primer Rv (5 µM) | 1 µM | 0,5 µM | 0,25 µM |
| MgCl₂ (25 mM) | 2 mM | 2 mM | 2 mM |
| Taq Polimerasa (1U/µl) | 0,026 U/µL | 0,04 U/µL | 0,03 U/µL |

Taula 6. Condicions finals per la PCR convencional.

| Primer | Seqüència | T^a Fusió | T^a annealing | Tamany |
|----------------|-------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------|
| IL13Rα1 | Fw: 5- TCCCAGTGTAGCACCAATGA-3 | 64,2 °C | 59 °C | 101 pb |
| | Rv: 5- TGAAGCTCAGTCACAGCAGA-3 | 67,7 °C | | |
| IL13Rα2 | Fw: 5- AAACAACAAATGAAACCCGACAA - 3' | 66,0 °C | 57 °C | 119 pb |
| | Rv: 5- GTCTTCACCTTCCCAGCATTG -3' | 65,8 °C | | |
| IL13 | Fw: 5'TGAGGAGCTGGTCAACATCA'3 | 64,7 °C | 59 °C | 75 pb |
| | Rv: 5'CAGGTTGATGCTCCATACCAT'3 | 63,7 °C | | |

Taula 7. Taula primers: Seqüències corresponents als oligonucleòtids específics emprats per l'amplificació de IL13Rα1, IL13Rα2 i IL-13 amb la corresponent T^a de fusió i d'annealing dels primers i el tamany del segment a amplificar.

2.5.4.1 Quantificació d'IL-13, IL13R α 1 i IL13R α 2

Per a quantificar l'expressió d'IL-13, IL13R α 1 i IL13R α 2 a pàncrees, a cèl·lules iNKT i Tef, es va fer el següent càlcul:

| | | |
|---|---|---|
| Pàncrees | | |
| $\frac{[\text{IL13}]/[\text{HPRT}]}{[(\text{V}\alpha 24/\text{J}\alpha 18)]/[\text{HPRT}]}$ | $\frac{[\text{IL13R}\alpha 1]/[\text{HPRT}]}{[(\text{V}\alpha 24/\text{J}\alpha 18)]/[\text{HPRT}]}$ | $\frac{[\text{IL13R}\alpha 2]/[\text{HPRT}]}{[(\text{V}\alpha 24/\text{J}\alpha 18)]/[\text{HPRT}]}$ |
| iNKT | | |
| $\frac{[\text{IL13}]}{[(\text{V}\alpha 24/\text{J}\alpha 18)]/[\text{CD3}\gamma]}$ | $\frac{[\text{IL13R}\alpha 1]/[\text{HPRT}]}{[(\text{V}\alpha 24/\text{J}\alpha 18)]/[\text{CD3}\gamma]}$ | $\frac{[\text{IL13R}\alpha 2]/[\text{HPRT}]}{[(\text{V}\alpha 24/\text{J}\alpha 18)]/[\text{CD3}\gamma]}$ |
| Tef | | |
| $\frac{[\text{IL13}]}{[\text{CD3}\gamma]}$ | $\frac{[\text{IL13R}\alpha 1]}{[\text{CD3}\gamma]}$ | $\frac{[\text{IL13R}\alpha 2]}{[\text{CD3}\gamma]}$ |

2.6 Anàlisi del producte de PCR en gel d'agarosa

El producte amplificat de totes les qPCR i PCR realitzades (CD3 γ , GAPDH, V α 24/C α , V α 24/J α 18, V β 11, Foxp3, HPRT, INS, PPY, PNLIP, IL-13, IL13R α 1 i IL13R α 2) es van córrer en un gel d'agarosa al 2% amb un volum final de 50 μ L de TAE a 1x, es va retallar la banda corresponent a la mida de cada amplímer i aquesta es va purificar usant el protocol corresponent al kit "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (GE Healthcare).

2.7 Seqüenciació

El producte purificat es portà a seqüenciar directament al *Servei de Genòmica i Bioinformàtica* de l' Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Unitat de recerca B de la UAB. La seqüenciació, segons la mida de l'amplímer a seqüenciar, es va fer mitjançant dos kits de marcatge: el *BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing* o *BigDye Terminator v1.1 Cycle sequencing* si els fragments a seqüenciar eren de pocs parells de bases. El seqüenciador utilitzat va ser *ABI31310xl* d'Applied Biosystems. Cada una de les seqüències s'obtingué per duplicat partint de cadascun dels dos primers (Forward i Revers). S'estudià els cromatogrames obtinguts amb el software *Chromas*, es comprovà que totes les seqüències no tenien aparentment cap error i s'alinearen mitjançant el programa *CLC Sequence Viewer 6* o usant el programa online *Clustal W*.

Finalment fent un *Blast*, es va comprovar a que gen corresponia el producte seqüenciat obtingut. En el cas dels estudis dels TCRs, a part de l'anàlisi esmentat es va usar l'eina online *IMGT/V-QUEST* per veure a quina cadena α i β corresponia cada un del segments obtinguts.

M&M. 3. Processament de les mostres de Sang Perifèrica

3.1 Obtenció de limfòcits de sang perifèrica o PBLs11

Es recolliren uns 50 ml de sang perifèrica en tubs estèrils amb heparina des de pacients amb T1D al debut i es van obtenir "Buffy coat" d'individus sans des del "Banc de Sang i Teixit" de Barcelona. Es va fer una dil·lució adient amb PBS 1x i es van separar els limfòcits de la resta de cèl·lules de sang perifèrica a partir d'un gradient de densitat utilitzant Ficoll (*Lymphoprep*). La sang es va carregar en tubs de 50 ml sobre el ficoll i es va centrifugar 30' a 600xg a temperatura ambient (TA). Les cèl·lules recuperades de la interfase es van rentar tres vegades amb PBS 1x + 2% Sèrum Boví Fetal (SBF). Un cop rentades, les cèl·lules es van resuspendre en un volum adequat de medi RPMI complet (10% de SBF + Penicilina/Streptomocina), es van contar amb la cambra de Neubauer i/o es criopreservaven amb una solució de SBF i 10% DMSO (medi de congelació) fins al seu ús o bé es dil·luïen amb Running Buffer (BSA, EDTA, 0,09% de àcida sòdica) (Milteny Biotec) per començar a treballar amb elles.

3.1.1 Obtenció de cèl·lules Treg

A partir dels limfòcits obtinguts, les cèl·lules Treg es van seleccionar utilitzant el kit de separació de *CD4+CD25+ Regulatory T cell Isolation Kit* (Milteny Biotec) usant el sistema Automacs. La separació es basava en dos parts: (a) Selecció negativa; on les cèl·lules s'incubaven amb un cocktail d'anticossos anti-humà conjugats a biotina (anti- CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ i CD235a) durant 10' a 4°C i on seguidament s'afegia el volum necessari de Microbeads anti-biotin i s'incubava durant 15' a 4°C, seguit d'un rentat amb Running buffer i una centrifugació a 300xg durant 10'. Les cèl·lules obtingudes es tornaven a resuspendre en un volum determinat de Running Buffer. Durant el procés de selecció negativa s'obtenien dos poblacions cel·lulars; les cèl·lules CD4⁺ i les CD4⁻. (b) amb les cèl·lules CD4⁺ es feia una selecció positiva; on s'incubaven amb Microbeads anti-CD25 durant 15' a 4°C, seguit d'un rentat i una centrifugació a 300xg durant 10'. Després de la selecció positiva s'obtenien dos poblacions cel·lulars, les cèl·lules amb un fenotip CD4⁺CD25⁺ corresponent a cèl·lules Treg i les que eren CD4⁺CD25⁻ corresponent a cèl·lules Tef (Fig.2).

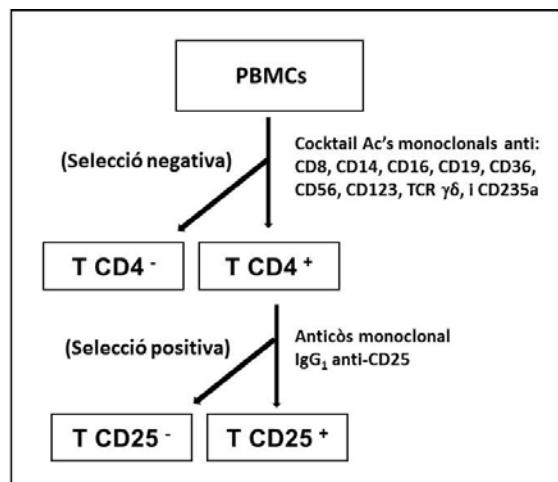


Figura 2. Separació de cèl·lules Treg i Tef utilitzant el sistema automacs

3.1.2 Obtenció de cèl·lules iNKT

Les cèl·lules iNKT es van seleccionar en base a la seva expressió de la cadena α invariante del TCR $V\alpha 24J\alpha 18$ amb el kit Anti-iNKT Microbeads Human (Milteny Biotec) usant el sistema Automacs. El kit es basa en una selecció positiva on s'incubaven les cèl·lules amb Anti-iNKT MicroBeads (Microbeads conjugades a un anticòs monoclonal anti- $V\alpha 24J\alpha 18$ humà, clon 6B11) durant 15'a 4°C. Seguidament es rentaven amb Running Buffer i es centrifugaven a 300xg durant 10'. Amb aquesta selecció positiva s'obtenien dos poblacions cel·lulars; les cèl·lules amb un fenotip $V\alpha 24J\alpha 18^+$ corresponent a les cèl·lules iNKT i les que eren $V\alpha 24J\alpha 18^-$ corresponent a un altre tipus cel·lular (Fig. 3).

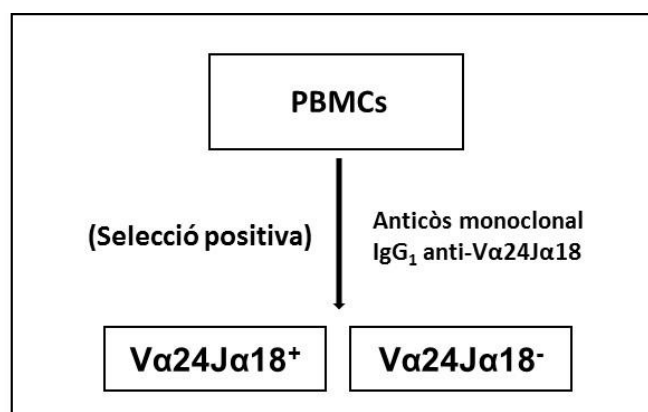


Figura 3. Selecció de cèl·lules iNKT usant el sistema Automacs.

M&M. 4. Cultius cel·lulars

4.1 Expansió *in vitro* de cèl·lules Treg i de cèl·lules iNKT

Les cèl·lules Treg CD4⁺CD25⁺ obtingudes, es van expandir *in vitro* amb PBMCs autòlegs irradiats (30 Gy), anti-CD3 (30ng/ml). A les 24h s'afegia la rh-IL2 (100U/ml, NIH). Als dies 5, 10 i 15 es feia un canvi de medi amb 100U/ml de rh-IL2. Per alguns dels experiments es van requerir cèl·lules Tef expandides, així, aquestes es van expandiren les mateixes condicions que les cèl·lules Treg però afegint 45U/ml de rh-12. Després d'aquests dies de cultiu, es confirmava el fenotip de les cèl·lules Treg i Tef per citometria de flux (*Veure: Protocols de tinció*).

Per una banda, una porció de les cèl·lules iNKT obtingudes, es van expandir *in vitro* en presència de cèl·lules C1R-CD1d⁺ irradiades a 45Gy preincubades amb α GalactosilCeramida (α GalCer) (sonicat a 37°C durant 10') durant 1h a 37°C, amb feeders autòlegs irradiats a 30Gy i afegint la rh-IL2 corresponent a les 24 hores. Al cap 5, 10 i 15 dies de cultiu, el medi era reemplaçat amb medi fresc amb 20U/ml de rh-IL2. Als 15 dies de cultiu aproximadament, es confirmava el fenotip de cèl·lula iNKT per citometria de flux (*Veure: Protocols de tinció, M&M. 5*). Per altra banda, una altra porció de les cèl·lules iNKT van ser expandides amb un estímul policlonal com la Fitohemaglutinina (PHA-L). Les cèl·lules van ser cultivades amb PBMCs autòlegs irradiats (30Gy) afegint 1 μ g/ml de PHA-L i 20U/ml de rh-IL2.

En tots dos casos el medi usat va ser: medi IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's) complementat amb un 8% de Sèrum humà, L- Glutamina (2 mM), Penicilina (100 U/ml) i Streptomicina (100 μ g/ml).

4.2 Expansió *in vitro* de cèl·lules iNKT amb anàlegs de l' α GalCer

Gràcies a una col·laboració amb el Dr. Llebaria, s'han estudiat diferents anàlegs lipídics (n=8) d'estructura similar a l' α GalCer, els quals són reconeguts i presentats per molècules de CD1d (*Taula. 6*). Els anàlegs tenen diferents característiques estructurals, tant a nivell de grup polar com a la composició de les cadenes lipídiques comparat amb l' α GalCer. Aquests anàlegs, es van classificar segons la seva capacitat d'estimulació d'esplenòcits i timòcits de ratolins, en anàlegs d'estimulació forta, intermitja o dèbil.

Per tant, cada un dels anàlegs lipídics a testar es van preincubar amb cèl·lules C1R-C1Rd⁺ durant 1h a 37°C i es van irradiar a 45Gy. Tot seguit, les C1Rd carregades amb els diferents anàlegs lipídics es van cocultivar amb cèl·lules iNKT (n=6). Com a control positiu de l'assaig, es van estimular les cèl·lules iNKT amb PHA-L i amb beads conjugades amb

α CD3CD28. A les 24h i 48h es va recollir el sobrenedant dels cocultius per poder analitzar la secreció de citocines.

| Anàleg | Composició | Estimulació |
|------------------|--|-------------|
| α -GalCer | C ₅₀ H ₉₉ NO ₉ | Forta |
| 1 | C ₅₁ O ₈ N ₂ H ₁₀₂ | Dèbil |
| 2 | C ₅₀ O ₆ N ₂ H ₁₀₀ | Intermitja |
| 3 | C ₅₁ O ₇ N ₂ H ₁₀₀ | Forta |
| 4 | C ₄₈ O ₆ N ₂ H ₉₂ | Forta |
| 5 | C ₅₀ O ₆ N ₂ H ₉₈ | Forta |
| 6 | ND | Intermitja |
| 7 | C ₅₁ O ₇ N ₂ H ₁₀₂ | Forta |
| 8 | C ₅₁ H ₉₅ NO ₄ S | Forta |

Taula 6. Anàlegs de l' α GalCer. La taula mostra els diferents anàlegs d'estructura similar a l' α GalCer, els quals són reconeguts i presentats per molècules de CD1d. A la taula s'indica la composició i si són d'estimulació forta, intermitja o dèbil.

M&M. 5. Protocols de tinció

5.1 Seccions de criòstat

A partir de blocs de teixit congelats de ratolins NOD i de mostres de teixit pancreàtic humà (Network of Pancreatic Organ Donors (nPOD) from Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF)) es van fer seccions de 4 μ m de gruix amb un criòstat (*Criostat Leica CM3050S*) al servei d'Histologia de Neurociències de la UAB. Les seccions es disposaven en portaobjectes i es deixaven assecar 30' a temperatura ambient (TA). Posteriorment, s'emmagatzemaven a -80°C fins al seu ús.

5.2 Tincions d'immunofluorescència sobre seccions de teixit

Les seccions de teixit congelades a -80°C esmentades a l'apartat 5.1 es van usar per fer tincions d'immunofluorescència (Fig.4):

- 1) Les preparacions a tenyir es deixaven assecar durant 30-45' a TA.
- 2) **Fixació:** s'afegien 100 μ l/secció de Paraformaldehid (BD Biosciences) dil·luït 1/10 durant 30' a TA. Seguidament es feien tres rentats de 3 min amb PBS 1x, per rehidratar i extreure l'excés de paraformaldehid.
- 3) **Bloqueig:** s'afegien 30-50 μ l (segons el tamany de la secció) de la solució de bloqueig (2% de Sèrum de cabra + un 1% de sèrum humà) i s'incubava 15' a TA sobre una cambra humida i fosca.

- 4) **Incubació amb l'anticòs primari:** Les seccions s'incubaven amb 60 µl l'anticòs primari (anticòs purificat no marcat) en una cambra humida i fosca durant 30-45' a TA. Després de l'incubació es feien tres rentats amb PBS 1x de 3 min.
- 5) **Incubació amb l'anticòs secundari:** S'afegien 60-100 µl de l'anticòs secundari (Goat anti mouse, Goat anti rat o Goat anti rabbit, segons l'origen de l'anticòs primari) incubant durant 45min-1h a TA en una cambra humida i fosca, seguits de tres rentats de 5 min.
- 6) **Tinció d'insulina:** En tots els casos, per identificar els illots pancreàtics és feia una tinció per insulina utilitzant 60 µl d'un anticòs anti-insulina (1/200). Aquest s'incubava 45' a TA, es rentava 3 cops amb PBSx1 i seguidament s'afegia l'anticòs anti-insulina (Goat anti-Guinea pig) durant 45' i les mostres es rentaven 3 cops amb PBSx1.
- 7) **Tinció nuclear:** Es posaven 60 µl de DAPI (1/3000) per marcar els nuclis cel·lulars incubant durant 14-20 min a TA a la cambra fosca i humida. Seguidament es feien tres rentats de 5 min cada un i l'últim s'assecava molt bé i les preparacions es muntaven directament amb medi de muntatge (*Fluoprep*), es segellaven i es mantenien a 4°C fins al seu anàlisi al microscopi.

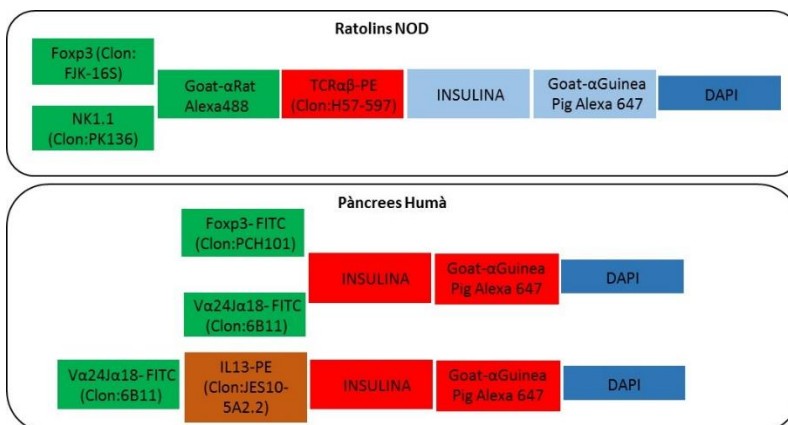


Figura 4. Combinació d'anticossos utilitzats per immunofluorescència: Anticossos utilitzats per a la detecció de cèl·lules Treg i cèl·lules iNKT a pàncrees de ratolins NOD i pàncrees humana.

5.3 Tinció de cèl·lules iNKT, Treg i Tef

Per confirmar la puresa de les cèl·lules iNKT i de les cèl·lules Treg obtingudes, així com també el fenotip d'aquestes un cop expandides *in vitro*, es van analitzar diferents marcadors superficials usant anticossos monoclonals específics per cada tipus cel·lular. En ambdós casos, les cèl·lules es van rentar amb PBS 1x + 2% SBF dos vegades a 300xg durant 2'. Es va treure el sobrenedant i es van afegir els anticossos corresponent per cada tipus cel·lular (Taula. 6):

1) Cèl·lules iNKT: CD3-PE-Cy7 a 1/100 (Clon: UCTH1, Biolegend), cadena α del TCR V α 24J α 18-PE (Clon: 6B11, Milteny Biotec), CD4 α -APC a 1/30 (clon: RPA-T4, Biolegend), CD8 β -PE-Cy5 a 1/50 (Clon: 2ST8.SH7, Beckman Coulter) i V β 11-FITC (Clon: C21, Beckman Coulter).

2) Cèl·lules Treg i/o Tef: En aquest cas, es van usar dos combinacions d'anticossos:

I. CD3 PERCP (Clon: UCHT1, BD Pharmingen) CD4-FITC (Clon: SK3, Becton&Dickinson) and CD25-PE (Clon: 3G10, Milteny Biotec).

II. CD4-PERCP, CD25-PE and Foxp3 Alexa488 (Clon: PCH101, eBioscience):

i. **Tinció intracel·lular per Foxp3:** La tinció de Foxp3 es va fer de dos maneres diferents:

(a) Després de la tinció de superfície, les mostres es van fixar usant 100 μ l de Paraformaldehid al 4% incubant durant 10 min a 4 $^{\circ}$ C i a la foscor. Després de la incubació es rentaven 3 vegades amb 300 μ l de PBS 1x + 2% de SBF per treure l'excés de Paraformaldehid i es feia un de tercer rentat amb PBS 1x + 0,1% de Saponina, centrifugant 300xg 5 min, per començar a obrir porus a la membrana citoplasmàtica. Seguidament, les cèl·lules es resuspenien amb 30 μ l de Sèrum humà amb un 0,3% de Saponina i s'incubaven durant 7 min a 4 $^{\circ}$ C i a la foscor. Després de la incubació i sense rentar, s'afegia directament l'anticòs anti-Foxp3 i s'incubava durant 30' a 4 $^{\circ}$ C i a la foscor. Finalment, les cèl·lules es rentaven amb 300 μ l de PBS 1x + 2% de SBF i es resuspenien en 150-200 μ l de PBSx1 sense sèrum, preparades per ser analitzades al citòmetre de flux.

(b) Seguint el protocol del kit "Foxp3/Transcription Factor Fixation/Permeabilization Concentrate and Diluent" de eBiosciences, un cop acabada la tinció superficial, s'afegia 1 ml de la solució de treball de fixació/permeabilització a les cèl·lules, es feia un vòrtex i s'incubava a 4 $^{\circ}$ C durant 30-60 minuts a la foscor. Seguidament es feien dos rentats amb 2 ml de Buffer de Permeabilització 1x, es centrifugava i es descartava el sobrenedant. Opcionalment, es feia un bloqueig afegint 100 μ l de sèrum de ratolí a un 2% dil·luït amb el Buffer de Permeabilització 1x i s'incubava a 4 $^{\circ}$ C durant 15 min i sense rentar, s'afegien 5 μ l de l'anticòs anti-Foxp3 i el corresponent control d'isotip al control negatiu dil·luït en Buffer de Permeabilització 1x i s'incubava a 4 $^{\circ}$ C durant 30 min i a la foscor. Es feien dos restants amb 2 ml de Buffer de Permeabilització 1x i finalment les cèl·lules es

resuspenien en 150-200 µl de PBS 1x sense sèrum per ser analitzades al citòmetre de flux.

En tots dos casos, el resultat de la tinció es va analitzar per citometria de flux (FACSCanto II, BD Biosciences) utilitzant el software BD FACSDiva™ (BD Biosciences) o el FlowJo pel seu anàlisi.

5.4 Tinció citoplasmàtica: Detecció de citocines

Per la tinció de citocines citoplasmàtiques, la tinció va ser la següent;

Tinció directa: Les cèl·lules T es cultivaven amb PMA/IO (20 ng/mL PMA i 1 µg/mL d'IO) durant 6 hores. Quan les cèl·lules portaven 2 hores amb la PMA/IO s'afegia la Brefeldina A (1 µg/mL) durant les 4 hores restants, la qual en desestructurar el transgolgi provocava la retenció de la citocina al citoplasma evitant la seva secreció. Un cop passades les 6 hores totals, les cèl·lules es recollien, es rentaven amb PBSx1 i es procedia a la tinció (Taula. 7):

- 1) **Tinció de superfície:** Incubació 30' a 4°C amb anticossos monoclonals específics de superfície; CD3-PE-Cy7, Vα24Jα18-FITC, CD4α-APC, seguits de dos rentats (PBS 1x + 2%SBF + 0,01% d'àcida sòdica).
- 2) Fixació de les cèl·lules amb Paraformaldehyd al 4% durant 10' a 4°C, seguit de dos rentats i un tercer rentat amb PBS + 0,1% Saponina per començar a obrir porus a la membrana plasmàtica.
- 3) **Permeabilització:** Les cèl·lules s'incubaven amb 30 µl de la solució de bloqueig (Sèrum Humà + 0,3% de Saponina) durant 7' a 4°C.
- 4) S'afegia l'anticòs anti-IL13 (Clon: JES10-5A2.2 de Milteny Biotec) i s'incubava durant 30' a 4°C.
- 5) Rentats amb PBSx1 i anàlisi per citometria de flux.

M&M. 6. Protocols de tinció

6.1 Elisa

6.1.1 Detecció de TNFα

L'activació de les cèl·lules iNKT es va assajar mesurant la secreció de TNFα en cultius on les cèl·lules iNKT (1×10^4 cèl/pouet) es van cocultivar amb PBMCs autòlegs irradiats a 30Gy (1×10^5 cèl/pouet) i amb cèl·lules C1Rd irradiades a 45Gy (2×10^4 cèl/pouet) utilitzades com a APC polsades amb diferents concentracions d'αGalCer (0.1, 1, 5, 10, 20, 40, 80, 100, 160 ng/ml) durant 1h a 37°C. Com a control positiu, les cèl·lules es van

estimar amb boletes conjugades a α CD3/CD28 (Dynabeads, Life Technologies). El sobrenedant dels cultius es van recollir a les 48 hores i la secreció de TNF α es va mesurar per ELISA (TNF α humà Antibody Parell, Invitrogen, Life Technologies) seguint el protocol adient. La concentració de TNF α es va quantificar en un sistema de lector de plaques, el *Multilabel Plater Reader VICTOR3* de Perkin-Elmer. El sobrenedant recollit a les 48h es va utilitzar per a mesurar els nivells de TNF α i veure d'aquesta manera si les cèl·lules iNKT expandides *in vitro* s'activaven en presència d'estímul. Per fer l'Elisa es va incubar una placa de 96w (Maxisorp (NUNC)) amb 100 μ l/pou de l'anticòs de captura dil·luït amb "coating Buffer" (NaCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, KCl) "overnight" a 4°C. Es va rentar la placa amb 300 μ l de "wash Buffer" (KH₂PO₄, K₂HPO₄, 3H₂O EDTA, Tween 20) i es va bloquejar afegint 300 μ l/pou de "Assay Buffer" (NaCl, Na₂HPO₄, KCl, Albúmina sèrica bovina (fracció V) i Tween 20) durant 1h a TA. Un cop bloquejada la placa, es va aspirar el contingut i es va extreure l'excés de líquid. Sense rentar-la es va afegir a cada pou 100 μ l de mostra i/o STD + 50 μ l de la dil·lució de l'anticòs de detecció i es va incubar 2h a TA fent un vòrtex suau continu. Seguidament, es va rentar la placa 5 vegades amb 300 μ l/pou de "wash Buffer" i es van afegir 100 μ l/pou de la dil·lució d'streptavidina-HRP incubant 30' a TA fent vòrtex continu seguit de 5 rentats amb "wash Buffer" tal i com s'ha esmentat anteriorment. Finalment, es va afegir 100 μ l/pou del substrat OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride) (Sigma Aldrich) i es va deixar incubar 30-45 min a TA amb vòrtex suau continu parant la reacció amb 100 μ l de la Solució stop (H₂SO₄ 1,8 N).

6.1.2 Detecció d'IL-13

Per a poder detectar l'IL-13 en els sobrenedants dels cultius de cèl·lules iNKT expandides *in vitro* amb diferents anàlegs de l' α GalCer, es va fer un Elisa d'IL-13 utilitzant el kit de "IL-13 humà Antibody Parell", Invitrogen de Life Technologies, seguint exactament els mateixos passos i utilitzant els mateixos buffers que els esmentats a l'apartat 6.1.1 per a la detecció del TNF α .

M&M. 7. Assajos de supressió

7.1 Assaig de supressió *in vitro*

Per analitzar la capacitat supressora de les Tregs i analitzar l'efecte adjuvant per les cèl·lules iNKT de modificar la capacitat supressora per les Tregs es van realitzar assajos de supressió *in vitro* utilitzant dos o tres tipus cel·lulars; iNKT, Tregs i Tefs. Primerament, es va analitzar la capacitat de les cèl·lules Treg d'inhibir la proliferació de les cèl·lules Tef a partir d'assajos de supressió *in vitro* usant diferents ràtios Treg:Tef (0.25:1, 0,5:1, 1:1, 2:1), on el número 1 era igual a 10000 cèl·lules/pou. Sobre aquests mateixos assajos, on

el número de cèl·lules Tef es va mantenir constant (10000 cèl/pou) es van afegir diferents proporcions de iNKT:Treg (4:0,5; 2:0,5; 1:0,5; 0,5:0,5 or 4:1; 2:1; 1:1; 0,5:1). En molts dels casos, el sobrenedant de les 48h de les cèl·lules iNKT en cultiu, es va afegir al cocultius de cèl·lules Treg:Tef, per veure l'efecte dels factors solubles secretats per les cèl·lules iNKT sobre la supressió per les cèl·lules Treg. En tots els casos, l'estímul utilitzat van ser beads conjugades amb anti-CD3/CD28 i totes es van cultivar conjuntament amb PBMCs autòlegs irradiats a 30Gy. El cultiu de cada tipus cel·lular soles es van usar com a controls. El sobrenedant dels cultius es van recollir a les 24 i 48 hores després de l'incubació, per analitzar els diferents factors solubles secretats. En tots els casos, la proliferació de les cèl·lules Tef es va mesurar per la incorporació de Timidina tritiada (Thy-H³) després de 4 dies de cultiu i el resultat es va analitzar usant el "β counter machine" (1450 Microbeta, Wallac Trimx, Liquid scintillation & Luminescence Counter).

7.2 Assaig de supressió *in vitro* iNKT:Tef

Per analitzar la capacitat supressora de les cèl·lules iNKT *ex vivo* i/o expandides *in vitro* amb αGalCer i/o PHA-L, es van realitzar assajos de supressió *in vitro* usant diferents ràtios de iNKT:Tef (0,25:1, 0,5:1, 1:1, 2:1, 4:1) on el número 1 era igual a 10000 cèl·lules/pou. PBMCs autòlegs irradiats a 30 Gy (10⁵ cèl/pou) es van afegir als cocultius i beads conjugades amb anti-CD3CD28 es van usar com a estímul. Com a control, els cultius de cada tipus cel·lular usats en els assajos (iNKTs i Tefs) es van cultivar sols. La proliferació de les cèl·lules Tef es va mesurar per la incorporació de Timidina tritiada (Thy-H³) tal i com s'ha esmentat a l'apartat 7.1. El sobrenedant dels cultius es van recollir a les 24 i 48 hores després de la incubació, per analitzar diferents factors solubles secretats.

7.3 Addició de rh-IL-13 i/o anticòs neutralitzant de la funció d'IL-13 en assajos de supressió *in vitro*

Per confirmar el paper de l'IL-13, un anticòs neutralitzant anti-IL-13 (clon JES10-5A2, Biologend) es va afegir als assajos de supressió esmentats a l'apartat 7.2. Les cèl·lules iNKT i Tef soles o usant diferents ràtios de iNKT:Tef (0,25:1, 0,5:1, 1:1, 2:1, 4:1), on el número 1 era 10000 cèl/pou, es van incubar sense o en presència de concentracions creixents de l'anticòs neutralitzant anti-IL13 (3, 30 i 90 µg/ml). Com a control, sobre els mateixos assajos de supressió es van afegir 30 µg/ml d'un isotip IgG₁ (Rata IgG₁, κ, Biologend). En tots els casos, com a estímul, es van usar beads conjugades a αCD3CD28. Els sobrenedants dels cultius es van recollir a les 48h.

En alguns experiments, diferents concentracions d'IL-13 recombinant humana (rh-IL13, Biologend) (0, 0.1 i 1 ng/ml) es van afegir als cultius de cèl·lules Tef i cocultius de iNKT:Tef. En tots dos casos, la proliferació de cèl·lules Tef es va mesurar mitjançant la incorporació de timidina- H^3 després de 4 dies de cultiu. Les cèl·lules es van polsar amb 1 Ci per pou de 3- [H] -metil-timidina (Perkin-Elmer) 16h abans de la recollida i la incorporació de timidina. Les dades es van analitzar en un comptador beta (1450 Microbeta, Wallac Trimx, de centelleig líquid i comptador de luminescència).

| Cèl·lules en suspensió | | |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|
| Cèl·lules iNKT (Humà) | | |
| Especificitat | AcMo | Procedència |
| TCR V α 24J α 18 | 6B11 | Milteny Biotec |
| TCR V β 11 | C21 | Beckman Coulter |
| CD3 | UCTH1 | Biologend |
| CD4 | RPA-T4 | eBiosciences |
| CD8 $\alpha\beta$ | 2ST8.5H7 | eBiosciences |
| Cèl·lules Treg i Tef (Humà) | | |
| CD3 | SK7 | Becton Dickinson |
| CD4 | SK3 | Becton Dickinson |
| CD25 | 3G10 | Milteny Biotec |
| CD3 | SK7 | Becton Dickinson |
| CD4 | SK3 | Becton Dickinson |
| Foxp3 | PCH101 | Becton Dickinson |
| CD127 | HIL-7R-M21 | eBiosciences |
| Immunofluorescència | | |
| Pàncrees Humà | | |
| Especificitat | AcMo | Procedència |
| TCR V α 24J α 18 | 6B11 | eBiosciences |
| TCR V β 11 | C21 | Beckman Coulter |
| Foxp3 | PCH101 | Becton Dickinson |
| IL-13 | JES10-5A2.2 | Milteny Biotec |
| Ratolins NOD | | |
| Especificitat | AcMo | Procedència |
| NK1.1 | PK136 | eBiosciences |
| Foxp3 | FJK-16S | eBiosciences |
| TCR $\alpha\beta$ | H57-597 | eBiosciences |
| Ratolins i Humà | | |
| Conjugats i d'altres | | |
| Especificitat | Procedència | |
| Insulina | Dako | |
| Dapi | Sigma Aldrich | |
| Goat anti Rat Alexa 488 | Invitrogen | |
| Goat anti Rat Alexa 594 | Invitrogen | |
| Goat anti mouse Alexa 488 | Invitrogen | |
| Goat anti mouse Alexa 594 | Invitrogen | |
| Goat anti Guinea Pig Alexa 647 | Invitrogen | |
| Goat anti Rabbit Alexa 488 | Invitrogen | |

Taula 7. AcMo utilitzats per a la

7.4 . Cultius transwells

Les anàlisis de requeriment de contacte cel·lular es van realitzar usant sistemes de cultiu transwell. PBMCs autòlegs irradiats a 30Gy (4×10^5 cells/well) es van cultivar en plaques de 24 pous amb un sistema transwell (porus of $0.4 \mu\text{m}$, LabClinics) usant diferents combinacions iNKT:Treg:Tef sembrades a la cambra de dalt o de baix del sistema transwell i on 1 era equivalent a 1×10^5 cells (Fig. 5).

Com a control, les diferents poblacions cel·lulars utilitzades a l'assaig es van cultivar soles. L'estímul utilitzat van ser beads conjugades a anti-CD3/CD28. El sobrenedant dels cultius es van recollir a les 24 i 48 hores, per analitzar els diferents factors solubles secretats.

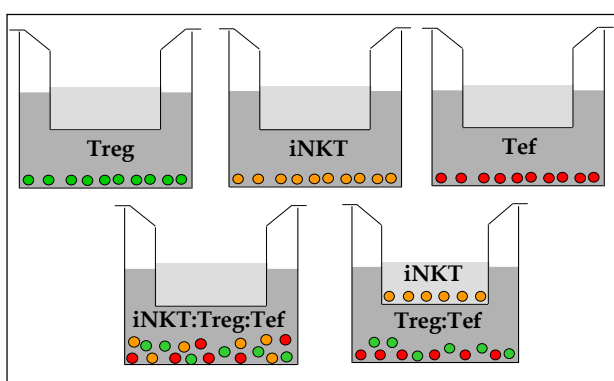


Figura 5. Combinació de cèl·lules iNKT:Treg:Tef en el sistema de cultiu transwell: Esquema de les diferents combinacions de cèl·lules iNKT:Treg:Tef que van ser cultivades a la cambra de dalt o a la cambra de baix del sistema transwell. En tots els casos, es va usar PBMCs autòlegs irradiats a 30Gy i beads conjugades a anti-CD3/CD28 com a estímul.

7.5. Cytometric Bead Array (CBA)

Dels sobrenedants recollits als assajos de supressió *in vitro*, així com dels cultius realitzats en sistemes de cultiu transwells es va analitzar la secreció d'una sèrie de factors solubles (IL-2, IFN γ , TNF α , IL-17A, IL-4, IL-10, IL-13) pel sistema Cytometric Bead Array (CBA). El sistema de CBA ens permet detectar diversos factor solubles (ex: citocines i/o factors de creixement), a partir de partícules individuals marcades amb fluorocroms, els quals la longitud d'ona d'emissió es llegeix entre 660-680 nm. En el cas d'un CBA múltiplex, que ens permet detectar diversos factors solubles a l'hora, cada una de les beads utilitzades està recoberta d'anticossos específics contra un factor soluble determinat. Aquestes beads, estan marcades amb el mateix fluorocrom però amb intensitats diferents de fluorescència, de manera que podem distingir cada una de les beads específiques d'un factor soluble determinat per la seva intensitat mitjana de fluorescència (MFI) a l'hora de fer l'anàlisi per citometria de flux (Fig. 6). Les beads associades a les molècules capturades, són detectades específicament per l'addició d'un anticòs associat a un fluorocrom (PE, emissió a 585 nm) anomenat anticòs de detecció.

Els passos a seguir per realitzar el CBA van ser els següents:

- 1) Incubació del sobrenedants recollits als assajos de supressió i/o cultius transwells, amb beads conjugades a anticossos específics per cada un dels factors solubles a detectar, durant 1h a TA.
- 2) Afegir directament (sense rentar) la quantitat d'anticòs de detecció adient i incubar durant 2h a TA i a la foscor.
- 3) Rentar amb 1ml de Wash Buffer i centrifugar a 200xg 5'.
- 4) Afegir 300 µl de Wash Buffer per analitzar al citòmetre (FACSCanto II, BD Biosciences).

Per a la quantificació de les mostres, en paral·lel es va fer un banc de dil·lucions seriades d'una solució de concentracions conegudes de cada un dels factors solubles a detectar (2500, 1250, 625, 312.5, 156, 80, 40, 20, 10, 0 pg/ml). La quantitat del factor soluble resultant, és directament proporcional a la quantitat de fluorescència obtinguda. Les dades obtingudes van ser analitzades utilitzant el software *FCAP Array v3*, que calcula la concentració de les mostres segons la corba d'estàndard realitzada.

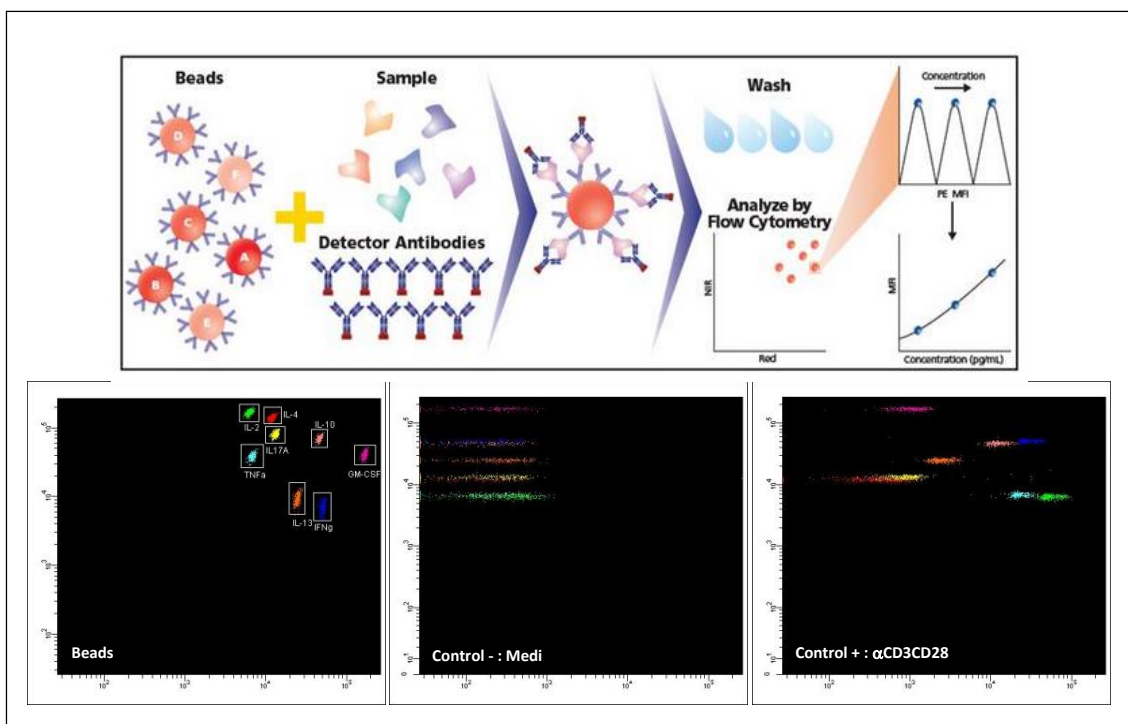


Figura 6. Cytometric Bead Assay (CBA): Representació esquematitzada de la tècnica del Cytometric Bead Assay (CBA) i representació dels resultats per citometria de flux.

Resultats Capítol 1

La IL-13 és el factor responsable de la regulació per cèl·lules iNKT. Alteracions de la secreció d'IL-13 com a responsables de la pèrdua de funció supressora de les cèl·lules iNKT a la Diabetis Tipus 1.

Background

Les cèl·lules iNKT són un subgrup de cèl·lules T CD3⁺ que expressen un TCR invariant format per una cadena α , TCRV α 24J α 18 associada preferentment a una cadena β , TCRV β 11, en el cas d'humans. El TCR invariant de les cèl·lules iNKT fa que aquestes cèl·lules reconeixen antígens lipídics tant propis o endògens, com també antígens lipídics exògens (derivats de patògens, o al·lèrgens entre d'altres) presentats en el context de CD1d. Les cèl·lules iNKT són considerades cèl·lules pont entre la immunitat innata i la l'adaptativa amb una clara funció efectora [146]. Menys coneguda i estudiada, és la seva influència sobre altres tipus cel·lulars, deguda principalment a la seva capacitat de secreció de citocines, tant de tipus Th1 com de tipus Th2 (IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-10, IL-5, IL-6, IL-13, IL-17, IL-21, TGF β i GM-CSF), així com a la secreció de diferents quimiocines. Aquesta capacitat de secretar de forma ràpida grans quantitats de citocines, ve donada pel seu contingut de transcrits preformats d'mRNA per a diverses citocines en el seu estat basal, que no és resting, si no d'activació/memòria [147]. A més, les cèl·lules iNKT poden regular la resposta immunitària d'altres maneres degut a la seva capacitat de secretar granzima B i perforina i poden expressar FasL.

Així, en aquest capítol, l'objectiu és estudiar la capacitat reguladora de les cèl·lules iNKT humanes obtingudes a partir de PBMCs d'individus sans i de pacients amb T1D.

C1.1 Cèl·lules iNKT *ex vivo* suprimeixen la proliferació de les cèl·lules T efectores autòlogues

Per estudiar si les cèl·lules iNKT humanes tenien capacitat reguladora, es van aïllar cèl·lules iNKT a partir de PBMCs de 3 individus sans tal i com està descrit a l'apartat de material i mètodes. La població de cèl·lules amb un fenotip $V\alpha 24J\alpha 18^+V\beta 11^+CD3^+$ corresponia de mitjana a un 0.2% de la població de PBMCs total en aquestes mostres (Fig. 1a), i contenia cèl·lules iNKTCD4⁺, iNKTCD8 β ⁺ i iNKTDN en un 46%, 22,8% i 20,8% respectivament. Quan les cèl·lules iNKT es van seleccionar en base a la cadena α del TCR invariante $V\alpha 24J\alpha 18^+$, usant el sistema automacs, es va obtenir una població el 85,5% de la qual eren cèl·lules iNKT amb el fenotip $V\alpha 24J\alpha 18^+V\beta 11^+CD3^+$. D'aquestes, el 47,9% eren cèl·lules amb fenotip iNKTCD4⁺, un 1,1% corresponia a cèl·lules iNKTCD8 β ⁺ i el 51,1% eren cèl·lules iNKT dobles negatives amb un fenotip $V\alpha 24J\alpha 18^+V\beta 11^+CD3^+CD4^-CD8\beta^-$ (Fig. 1b). Els nivells de iNKTC8 β ⁺ eren molt reduïts en comparació amb els nivells trobats a PBMCs totals, suggerint, que aquest subgrup de cèl·lules iNKT-CD8 β ⁺, és una població cel·lular més làbil i no van aguantar bé el procés de separació de les cèl·lules iNKT.

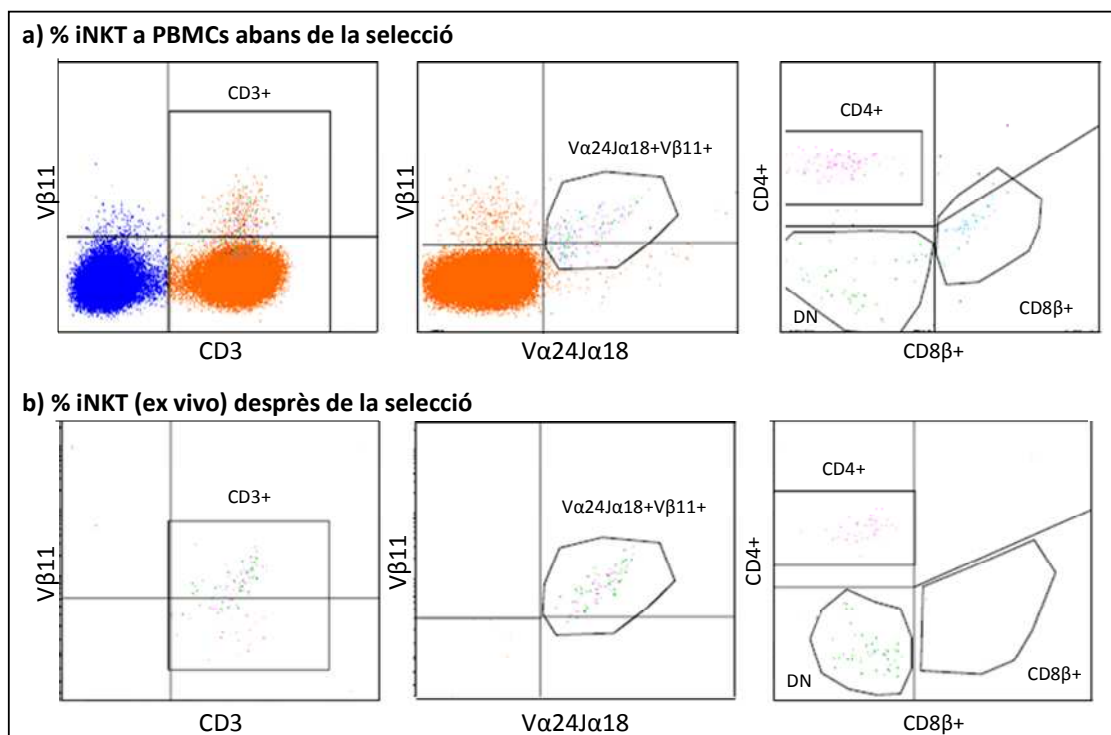


Figura 1. Aïllament de cèl·lules iNKT a partir de PBMCs de controls sans. a) Detecció de cèl·lules iNKT als PBMCs de controls sans. b) Fenotip de les cèl·lules iNKT aïllades després de la separació usant el sistema automacs. La figura mostra un exemple de tots els realitzats.

Es va analitzar la capacitat de les cèl·lules iNKT obtingudes per a suprimir la proliferació de cèl·lules T efectores (Tef) autòlogues. Per això, es van cultivar les cèl·lules iNKT amb cèl·lules Tef autòlogues ($CD4^+CD25^-$) usant diferents ràtios de cèl·lules iNKT i Tefs. Es va mesurar la proliferació cel·lular per la incorporació de Thy- H^3 en presència d' anti-CD3/CD28. Els resultats van demostrar que les cèl·lules iNKT *ex vivo*, inhibien la proliferació de les cèl·lules Tef autòlogues i que aquesta inhibició augmentava a mesura que augmentava el nombre de cèl·lules iNKT afegides al cultiu (Fig. 2a). Així, es va aconseguir una inhibició de la proliferació de les cèl·lules Tef al voltant del 40% a un ràtio 1:1 de iNKT:Tef. L'anàlisi estadística de les dades, va demostrar que les diferències entre els ràtios 0,5:1 vs 1:1 de iNKT:Tef eren estadísticament significatives ($p = 0,036$) (Fig. 2b). La proliferació de les cèl·lules iNKT soles va ser similar a la de les cèl·lules utilitzades com a feeders.

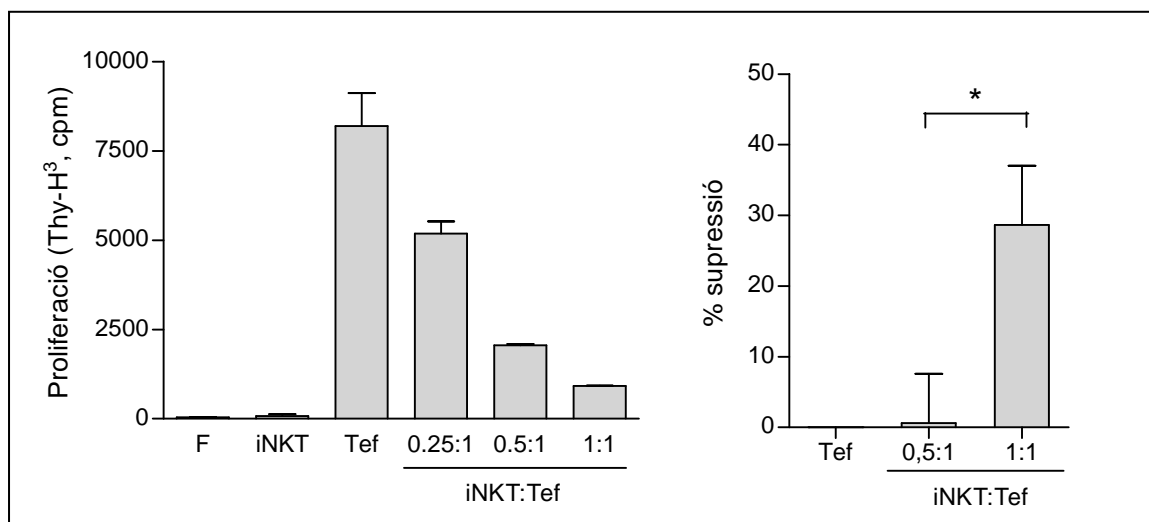


Figura 2. Les cèl·lules iNKT *ex vivo* supprimeixen la proliferació de cèl·lules Tef autòlogues. a) Proliferació de cèl·lules Tef humanes d'individus sans ($n=3$) en presència de diferents ràtios de iNKT:Tef amb cèl·lules iNKT autòlogues directament després del seu aïllament. Les dades de proliferació mostren un exemple dels tres experiments realitzats. b) Mitjana del percentatge de supressió de tots els experiments realitzats ($n=3$). Les diferències són estadísticament significatives entre 0,5:1 vs 1:1 ($p = 0,0364$).

C1.2 Cèl·lules iNKT expandides *in vitro* mantenen la capacitat per suprimir la proliferació de les cèl·lules Tef autòlogues

Tal i com s'havia vist a les mostres la freqüència de cèl·lules iNKT era de l'ordre de 0,1-0,3% als PBMCs. Per tal d'aconseguir un nombre suficient de cèl·lules iNKT per a estudiar aquest fenomen, una part d'aquestes cèl·lules iNKT (C1.1) van ser expandides *in vitro* amb α GalCer. Es va caracteritzar la població de cèl·lules expandides *in vitro*

analitzant l'expressió del TCR invariant $V\alpha 24J\alpha 18$ i TCR $V\beta 11$ per citometria de flux així com també la seva especificitat per l' α GalCer i la restricció per CD1d. Aquestes cèl·lules iNKT obtingudes després de l'expansió *in vitro*, l'eren positives per $V\alpha 24J\alpha 18$, $V\beta 11$, CD3 i expressaven el coreceptor CD4 (Fig. 3a). Quant a la seva especificitat per l' α GalCer, es va mesurar la producció de TNF α per Elisa en presència de concentracions creixents d' α GalCer i es va demostrar que les cèl·lules iNKT responien a l'estimulació de manera depenent de dosi d' α GalCer. A més, la secreció de TNF α només es produïa quan les cèl·lules presentadores d'antigen eren cèl·lules C1R que expressaven CD1d (Fig. 3b), ja que quan les cèl·lules iNKT van ser estimulades amb la línia limfoblastoide de C1R CD1d⁻ no es va detectar secreció de TNF α (Fig. 3b).

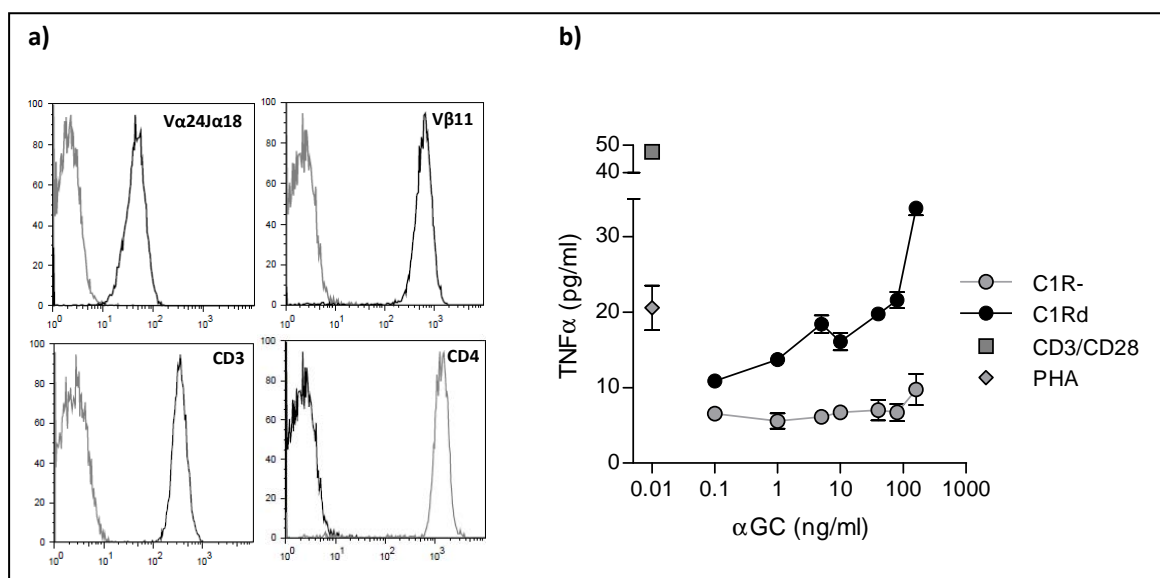


Figura 3. Caracterització de les cèl·lules iNKT expandides *in vitro*. (a) **Fenotip.** Anàlisi per citometria de flux de cèl·lules iNKT humanes expandides *in vitro* usant anticossos monoclonals específics pel TCR invariant $V\alpha 24J\alpha 18$, TCR $V\beta 11$, CD3 i CD4. (b) **Especificitat antigènica i restricció per CD1d.** Secreció de TNF α (n=8) per cèl·lules iNKT estimulades amb diferents concentracions d' α GalCer en presència de cèl·lules C1R- o C1Rd utilitzades com APCs. Estimulació amb beads conjugades a α CD3/CD28 o PHA-L com a control positiu.

Es va analitzar la capacitat d'aquestes cèl·lules iNKT expandides *in vitro* per suprimir la proliferació de cèl·lules Tef autòlogues en assajos de supressió *in vitro* com els descrits anteriorment (C1.1). Els resultats obtinguts van indicar que les cèl·lules iNKT expandides *in vitro* mantien la capacitat per suprimir la proliferació de les cèl·lules Tef autòlogues, perquè disminuïa la incorporació de timidina tritiada quan aquestes s'afegien al cultiu. Com en el cas de les cèl·lules iNKT *ex vivo*, aquesta inhibició era depenent de la quantitat de cèl·lules iNKT afegida al cultiu i estadísticament significativa quan es va comparar amb la capacitat proliferativa de les cèl·lules Tef autòlogues soles (Tef vs 2:1

iNKT: Tef $p=0,050$) (Fig. 4). A més les iNKTs expandides *in vitro* mostraven una major capacitat de supressió que les cèl·lules iNKT *ex vivo*, cosa que podria estar relacionada amb una major puresa de la població de cèl·lules iNKT obtinguda després de l'expansió *in vitro*.

Per tant, amb aquestes dades, es demostra que (a) les cèl·lules iNKT *ex vivo* tenen capacitat supressora i (b) que quan aquestes són expandides *in vitro* amb α GalCer, mantenen la seva capacitat funcional produint nivells de supressió més alts que els observats amb cèl·lules iNKT *ex vivo*.

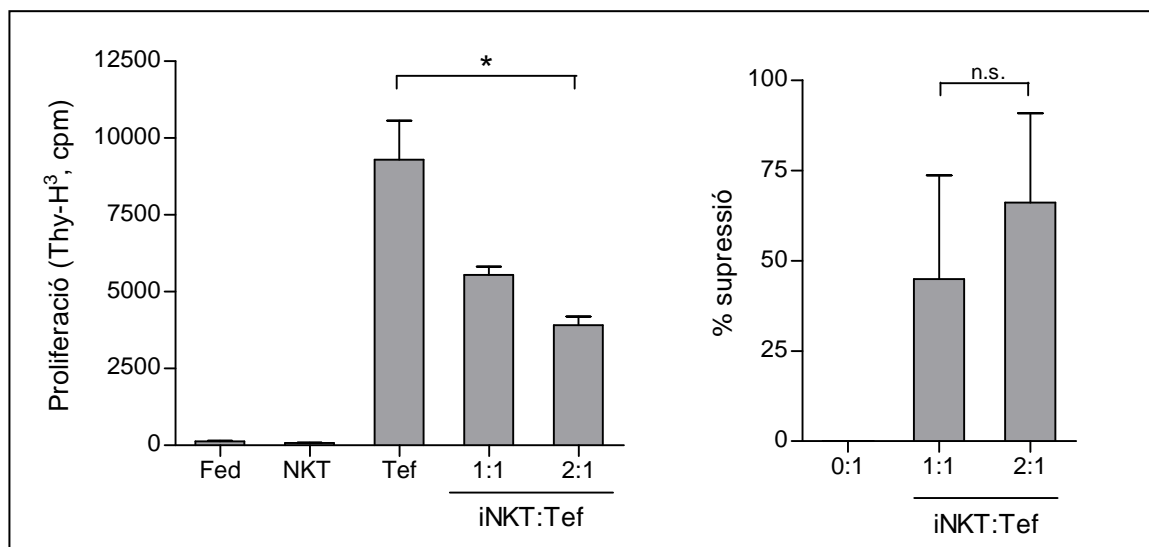


Figura 4. Les cèl·lules iNKT expandides *in vitro* supprimeixen la proliferació de cèl·lules Tef autòlogues. a) Proliferació de cèl·lules Tef, usant diferents ràtios iNKT:Tef amb cèl·lules iNKT expandides *in vitro*. Les dades són representatives de nou experiments realitzats. La disminució de la proliferació en presència de cèl·lules iNKT és estadísticament significativa usant un ràtio 2:1 iNKT:Tef ($p=0,0143$). b) Mitjana del percentatge de supressió de la proliferació de cèl·lules Tef de totes les mostres analitzades ($n=9$). En tots els casos, l'estímul usat va ser beads conjugades amb antiCD3/CD28 i la proliferació es va mesurar per incorporació de Thy-H³.

Diferents estudis realitzats amb Així, el que es va fer van ser Quan es va estudiar la capacitat de les cèl·lules iNKT per suprimir cèl·lules Tef expandides *in vitro*, en canvi, el percentatge de supressió era més baix que utilitzant cèl·lules T naive (Fig. 5). L'anàlisi estadística va mostrar que la diferència entre la supressió de les cèl·lules Tef no exp vs les Tef expandides era estadísticament significativa ($p=0,050$). Aquesta diferència es podria explicar amb els resultats d'un estudi fet amb cèl·lules iNKT de ratolins NOD on es proposava que les iNKTs exercien la seva funció reguladora preferentment a nivell d'activació i/o diferenciació de les cèl·lules T naive [143].

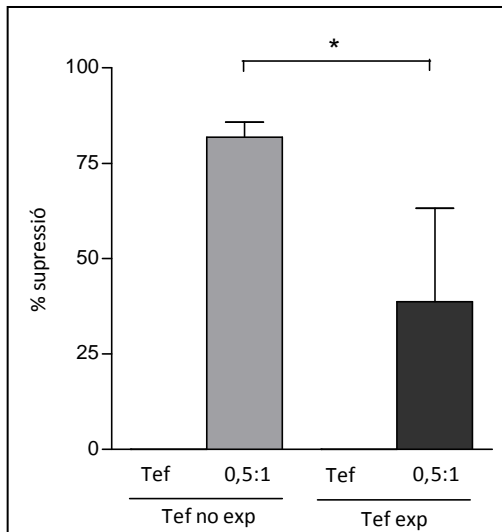


Figura 5. Les cèl·lules iNKT suprimeixen més fàcilment les cèl·lules Tef no expandides *in vitro*. La gràfica mostra el % de supressió per cèl·lules iNKT, usant cèl·lules Tef sense expandir o expandides *in vitro*. La gràfica mostra un experiment dels cinc realitzats. Les diferències entre la supressió produïda amb cèl·lules Tef no exp. vs Tef exp va ser estadísticament significativa (T-student *p= 0,050).

C1.3 La supressió per cèl·lules iNKT no és dependent de contacte cel·lular si no de la secreció de factors solubles

Per intentar esbrinar el mecanisme mitjançant el qual les cèl·lules iNKT podien duu a terme la supressió de les cèl·lules Tef, es va estudiar primer si la disminució de la proliferació era deguda a una alteració de la secreció d'IL-2, mecanisme que havia estat proposat per a les cèl·lules Treg. Per tant, es va mesurar la secreció d'IL-2 en els sobrenedants de les 24h dels cocultius de diferents combinacions de cèl·lules iNKT i Tefs en un sistema de cultiu transwell. Com s'observa a la Fig. 6, la font principal de secreció d'IL-2 eren les cèl·lules Tef activades i l'addició de cèl·lules iNKT, disminuïa significativament la seva secreció. Per corroborar que la font principal de producció d'IL-2 fossin les cèl·lules Tef i no les cèl·lules iNKT, es van fer cocultius de cèl·lules iNKT:Tef on unes o altres estaven irradiades i per tant, no podien produir IL-2.

Els resultats van mostrar, que en els cocultius, on les cèl·lules Tef estaven irradiades, disminuïa significativament la concentració d'IL-2 al sobrenedant. Aquesta disminució no era significativa quan s'irradiaven les cèl·lules iNKT, ja que si és detectava secreció d'IL-2. Per tant, aquestes dades confirmen que la IL-2 detectada als cocultius és principalment secretada per les cèl·lules Tef.

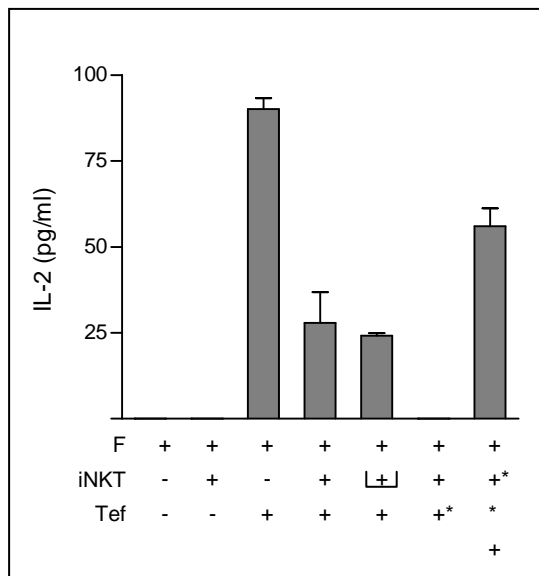


Figura 6. La presència de cèl·lules iNKT en els cultius de cèl·lules Tef, fa disminuir els nivells d'IL-2 d'una manera independent del contacte cel·lular. Secreció d'IL-2 detectada a les 24h en els sobrenedants dels cocultius iNKT:Tef usant diferents combinacions. El símbol (I) indica que les cèl·lules van ser sembrades en diferents cambres del sistema transwell i la seva absència que les cèl·lules van ser cultivades juntes. El símbol (*) indica cèl·lules irradiades. Les dades són representatives de cinc experiments realitzats. F, cèl·lules Feeders.

Així, els resultats van mostrar una certa correlació, entre la disminució de la proliferació de les cèl·lules Tef i la reducció de la secreció d'IL-2 en presència de les cèl·lules iNKT en els cocultius. Aquestes dades suggerien que possiblement un dels mecanismes utilitzats per les cèl·lules iNKT per duu a terme la seva funció supressora, era inhibir la secreció d'IL-2 per part de les cèl·lules Tef.

També es va estudiar el possible requeriment del contacte cel·lular per a la funció supressora de les cèl·lules iNKT. Es van cultivar les cèl·lules iNKT a la cambra de baix del sistema transwell junt amb les cèl·lules Tef o alternativament a la cambra de dalt separades per una membrana semipermeable. Els resultats van mostrar que les cèl·lules iNKT inhibien la secreció d'IL-2 independentment de contacte cel·lular. La reducció en els nivells d'IL-2 van ser equivalents, tant si les cèl·lules iNKT estaven cultivades conjuntament amb les cèl·lules Tef a la mateixa cambra o si pel contrari, estaven cultivades en cambres separades (Fig. 6).

Aquests resultats suggerien que el mecanisme de supressió produït per les cèl·lules iNKT implicava la secreció de factors solubles i no el contacte cel·lular.

C1.4 La IL-13 és el factor soluble implicat en la funció supressora de les cèl·lules iNKT

Per a determinar si d'altres citocines eren un factor important per a la supressió per cèl·lules iNKT, es va mesurar la concentració d'un conjunt de citocines en els sobrenedants dels cocultius de cèl·lules iNKT i Tefs, així com en els cultius de les poblacions cel·lulars individuals, per poder determinar l'aportació de cadascuna de les cèl·lules utilitzades a l'assaig.

L'estimulació dels cultius individuals de cèl·lules Tef i iNKTs va donar lloc a la secreció de diverses citocines incloent IFN γ i TNF α com a citocines pro-inflamatòries i IL-4 i IL-13, però no IL-10, com a citocines immunomoduladores (Fig. 7a i 7b). Les cèl·lules iNKT secretaven nivells més alts de citocines immunomoduladores (IL-4 i IL-13) que les cèl·lules Tef, però en qualsevol casla concentració d'aquestes dues citocines, augmentava en els cocultius de cèl·lules iNKT: Tefs (Fig. 7b). L'augment més significatiu que es va observar als cocultius va ser el de la secreció d'IL-13, que va passar de 17,25 pg/ml de mitjana als cultius de Tef soles, als 2125,84 pg/ml detectats quan es van afegir les cèl·lules iNKT, condicions de cultiu en les quals s'havia demostrat la supressió de la proliferació de les cèl·lules Tef. L'augment de secreció d'IL-13 no va ser depenent de contacte, ja que tant si les cèl·lules iNKT estaven conjuntament cultivades amb les cèl·lules Tef o pel contrari estaven separades, els nivells de secreció d'IL-13 van ser similars (Fig. 8).

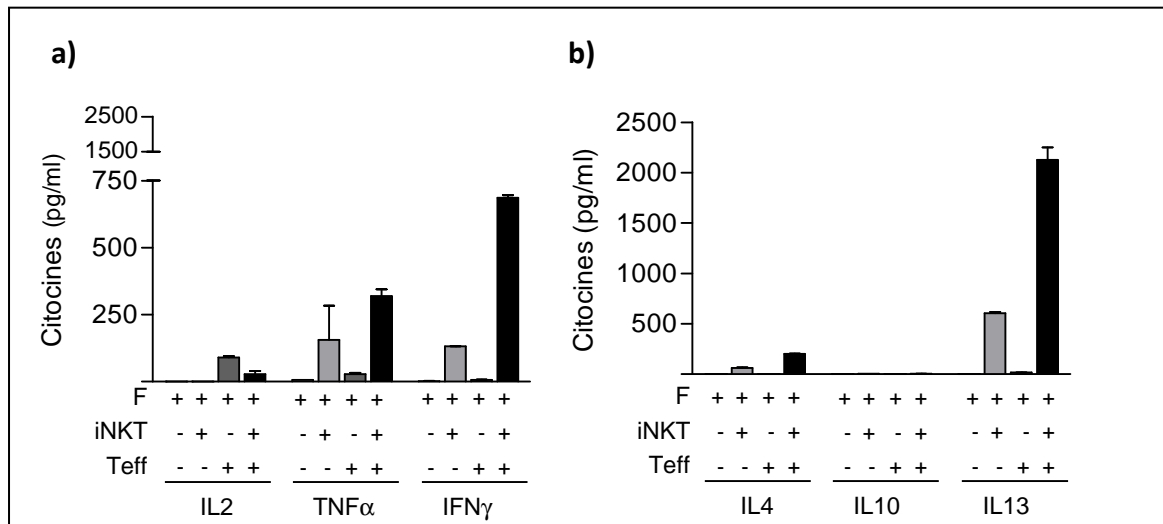


Figura 7. La secreció d'IL-13 no depèn de contacte cel·lular. La gràfica mostra la secreció d'IL-13 mesurada per CBA en el sistema de cultiu transwell, quan les cèl·lules iNKT estan sembrades conjuntament amb les cèl·lules Tef o pel contrari, estan sembrades per separat. El signe (+) indica que les cèl·lules van ser sembrades en diferents cambres del sistema transwell i la seva absència que les cèl·lules van ser cultivades juntes. Les dades són representatives de 5 experiments realitzats. F, cèl·lules feeders.

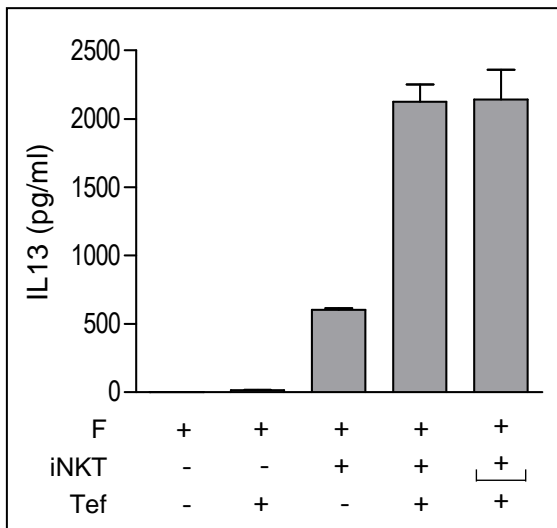


Figura 8. La secreció de IL-13 no depèn del contacte cel·lular. La gràfica mostra la secreció d'IL-13 mesurada per CBA en el sistema de cultiu transwell, quan les cèl·lules iNKT estan sembrades conjuntament amb les cèl·lules Tef o pel contrari, estan sembrades per separat. El signe (I) indica que les cèl·lules van ser sembrades en diferents cambres del sistema transwell i la seva absència que les cèl·lules van ser cultivades juntes. Les dades són representatives de 5 experiments realitzats. F, cèl·lules feeders.

Aquestes dades, semblaven indicar que l'IL-13 secretada per les cèl·lules iNKT era responsable de la seva funció supressora. Per confirmar el paper de l'IL-13 en el mecanisme supressor de les cèl·lules iNKT, es van fer assajos de supressió *in vitro* de la proliferació de cèl·lules Tef per cèl·lules iNKT afegint un anticòs neutralitzant anti-IL13 (Fig. 9). Els resultats van mostrar que l'addició de concentracions creixents de l'anticòs bloquejant, restauraven, com a mínim parcialment, la proliferació de les cèl·lules Tef de manera dependent de dosi. En canvi, no es va observar cap canvi a la proliferació de les cèl·lules Tef quan es va afegir un anticòs irrellevant (Isotip IgG₁) en les mateixes condicions. Es confirmava per tant que la IL-13 era responsable, com a mínim en part, de la funció supressora de les cèl·lules iNKT.

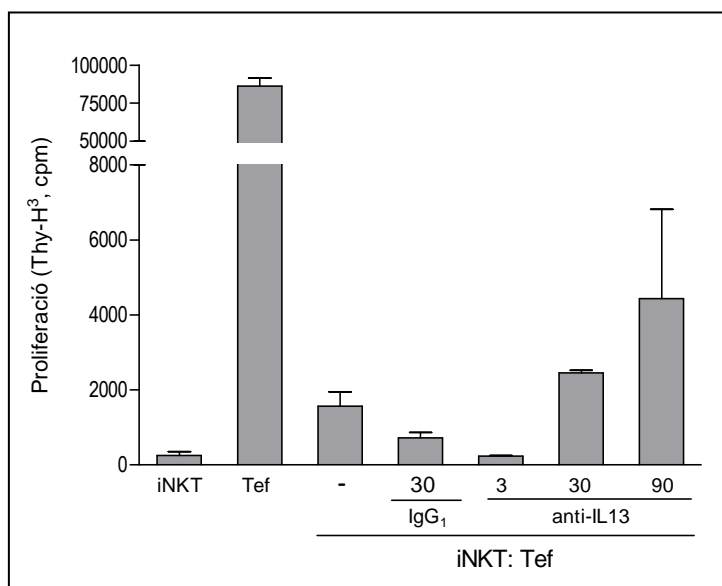


Figura 9. El bloqueig d'IL-13 inhibeix la supressió de la proliferació de les cèl·lules Tef. Els assajos de supressió *in vitro* es van realitzar en absència o presència de concentracions creixents d'un anticòs neutralitzant anti-IL13 (3, 30, 90 µg / ml). Com a control, es van utilitzar 30 µg/ml d'un isotip IgG₁ irrellevant, en les mateixes condicions. Les dades mostren un exemple representatiu de cinc donants analitzats.

C1.5 Les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D són deficients suprimint la proliferació de les cèl·lules Tef

Com l'interès general del treball era l'estudi de les cèl·lules iNKT en el desenvolupament de la T1D, vam voler comprovar si les cèl·lules iNKT dels pacients amb T1D també tenien capacitat supressora. Així, es va analitzar la capacitat supressora de les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D al debut clínic de la malaltia en assajos de supressió *in vitro* utilitzant diferents ràtios iNKT:Tef, tal i com s'ha fet pels individus sans i es va comparar amb la funció supressora de cèl·lules iNKT derivades de controls sans del mateix rang d'edat. Els resultats van mostrar que les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D expandides *in vitro*, en les mateixes condicions que les cèl·lules iNKT de controls, no només no suprimien la proliferació de cèl·lules Tef autòlogues, si no que en presència de cèl·lules iNKT, les cèl·lules Tef dels pacients, proliferaven de forma normal. Aquesta incapacitat de suprimir la proliferació de les cèl·lules Tef es representa amb els valors negatius del % de supressió de la proliferació cel·lular (Fig. 10a i 10b). Quan es va comparar la capacitat supressora de les cèl·lules iNKT de donants sans (HD) amb les de pacients amb T1D, a aquells ràtios de cèl·lules iNKT:Tef on les cèl·lules iNKT d'individus sans suprimien la proliferació cel·lular fins a un 66%, les cèl·lules iNKT de pacients no tenien cap efecte sobre la proliferació de les cèl·lules Tef autòlogues. Les diferències en la capacitat de supressió eren estadísticament significatives (0,5:1, $p=0,0056$ i 1:1, $p=0,0048$ HD vs T1D) (Fig. 10c).

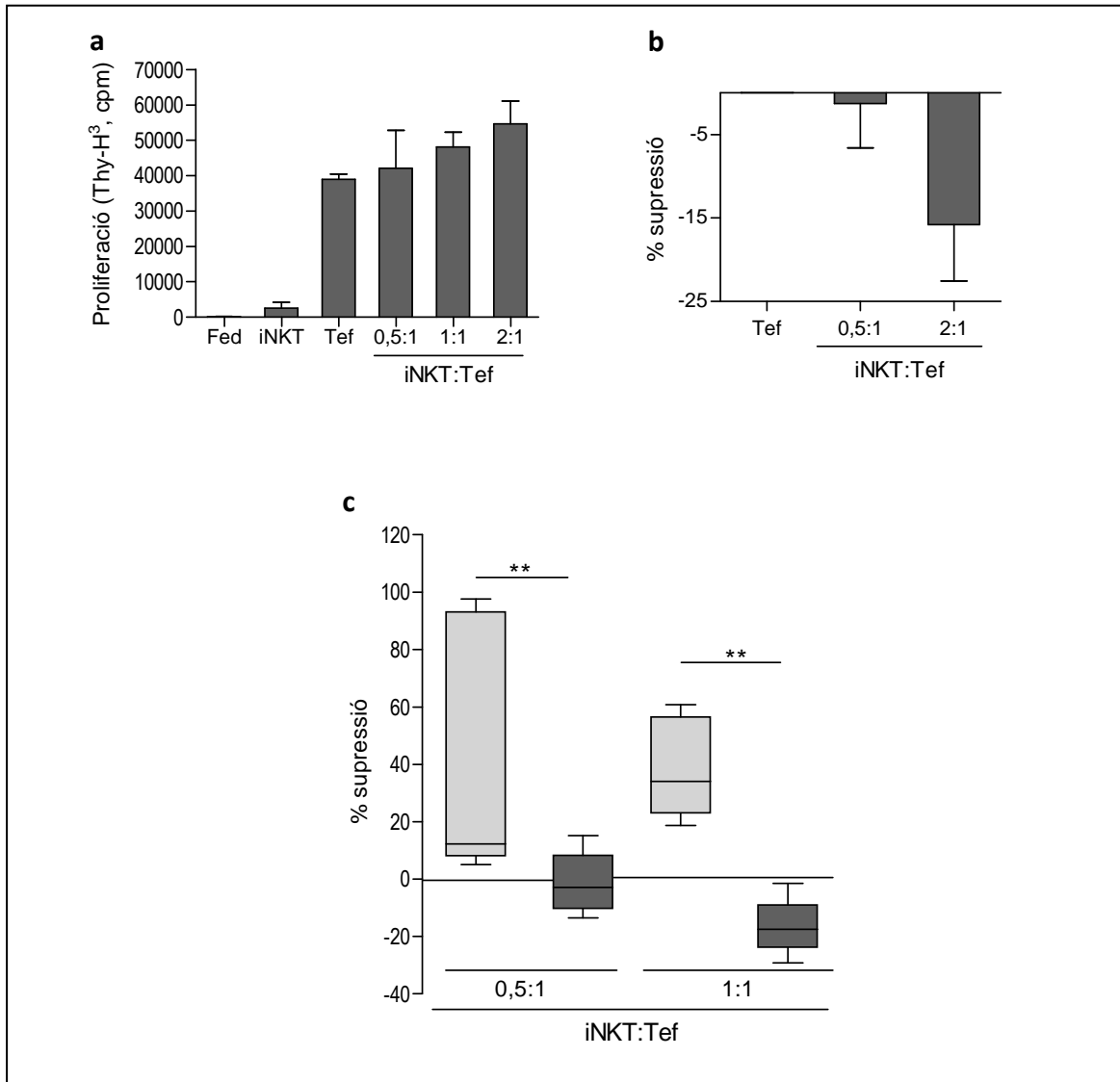


Figura 10. Les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D no suprimeixen la proliferació de les cèl·lules Tef autòlogues. (a) Proliferació cel·lular mesurada per la incorporació de Thy-H³, usant diferents ràtios iNKT:Tef a mostres de pacients amb T1D al debut la malaltia (n=5). Les dades mostrades són representatives de deu experiments realitzats. (b) Mitjana del percentatge de supressió de la proliferació de tots els experiments realitzats (n=10). (c) Comparació de la supressió produïda per cèl·lules iNKT de donants sans (gris clar) (n=8) i de pacients amb T1D (gris fosc) (n=5) usant diferents ràtios iNKT:Tef. Les diferències entre la supressió per cèl·lules iNKT de donants sans i de pacients amb T1D són estadísticament significatives usant ràtios iNKT:Tef de 0,5:1 i 1:1 (0,5:1, p=0,0056 i 1:1, p=0,0048 Controls vs T1D).

Es va voler estudiar si aquesta manca de supressió era deguda a una deficiència funcional intrínseca de les cèl·lules iNKT o bé, a una alteració de les cèl·lules Tef dels pacients amb T1D al debut. Per això, es va analitzar la capacitat de cèl·lules iNKT derivades de controls sans i de pacients amb T1D per a suprimir la proliferació de cèl·lules Tef al·logèniques derivades de diabètics o controls sans respectivament. Les dades van mostrar, que les cèl·lules iNKT derivades de pacients amb T1D tampoc suprimien la proliferació de les cèl·lules Tef al·logèniques procedents de controls sans ni

la de cèl·lules Tef al·logèniques derivades de pacients amb T1D. Contràriament, les cèl·lules iNKT de controls sans inhibien la proliferació de les cèl·lules Tef de pacients amb T1D amb nivells similars a com inhibien les cèl·lules Tef de controls. Aquestes dades indicaven que la manca de supressió observada a pacients amb T1D, no era resultat d'una alteració de les cèl·lules Tef dels pacients, sinó que era degut a un defecte intrínsec de les cèl·lules iNKT dels pacients amb T1D (Fig. 11a i 11b).

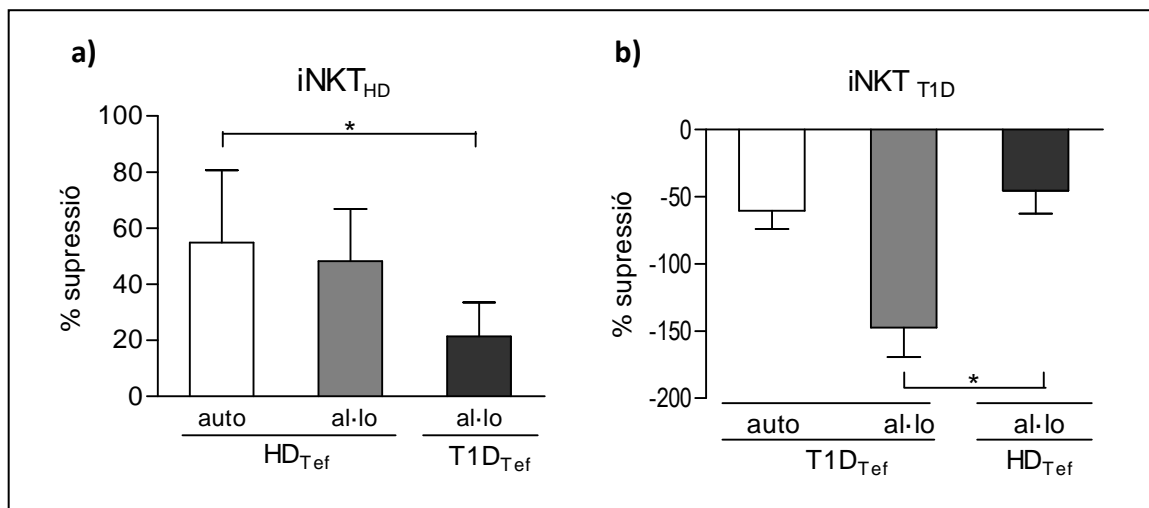


Figura 11. Les cèl·lules iNKT dels pacients amb T1D no suprimeixen la proliferació de les cèl·lules Tef al·logèniques derivades d'individus sans i/o de pacients amb T1D. Percentatge de supressió de la proliferació de les cèl·lules Tef d'individus controls (n=2) i de pacients amb T1D al debut de la malaltia (n=2) usant cèl·lules iNKT d'individus sans (a) i de pacients amb T1D (b) a un ràtio 1:1 iNKT:Tef. Les dades són representatives de cinc experiments realitzats. La supressió per cèl·lules iNKT és significativament diferent entre iNKT_{HD}:Tef_{HD} vs iNKT_{HD}:Tef_{T1D}, p=0,0201 i iNKT_{T1D}:Tef_{T1D} vs iNKT_{T1D}:Tef_{HD}, p=0,0379.

C1.6 La deficiència funcional de les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D és deguda a una baixa secreció d'IL-13

A individus sans, s'havia observat que la capacitat supressora de les cèl·lules iNKT depenia, com a mínim en bona part, de la seva secreció d'IL-13. Per tant, es va voler determinar si la deficiència en la supressió de cèl·lules Tef per part de cèl·lules iNKT de pacients amb T1D al debut podria estar relacionada amb una alteració en la secreció d'IL-13 per aquestes cèl·lules. Es va mesurar la capacitat de secreció d'IL-13 en els sobrenedants del cultiu de cèl·lules iNKT d'individus sans i de pacients amb T1D en les condicions d'estimulació usades en els assajos de supressió (estimulació amb α CD3/CD28). En aquests experiments es va demostrar que les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D secretaven nivells significativament menors d'IL-13 que les cèl·lules iNKT

d'individus sans (Fig. 12). A més, la secreció d'IL-13 no augmentava en els cocultius de cèl·lules iNKT:Tef tal i com s'havia observat en el cas d'individus sans (Fig. 7b).

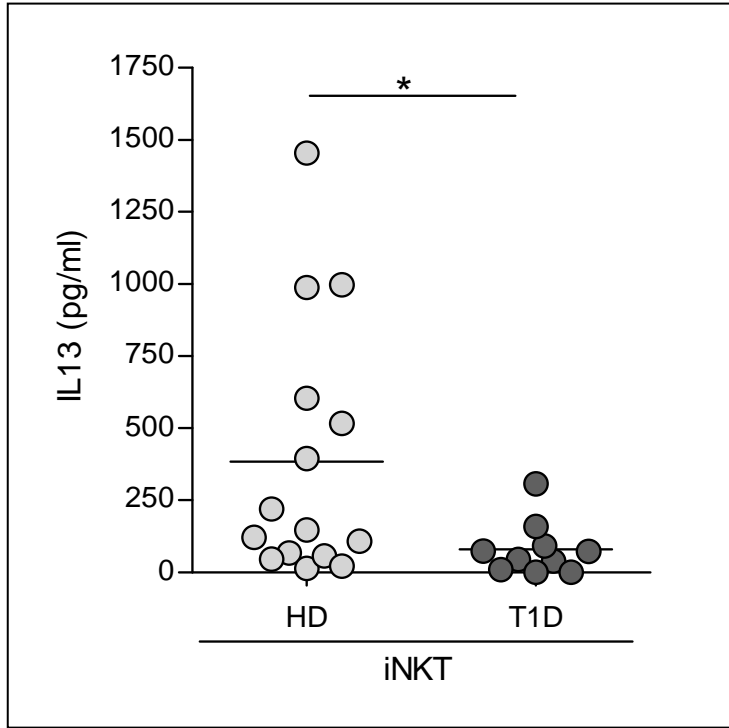


Figura 12. Les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D mostren defectes en la secreció d'IL-13.

Secreació d'IL-13 per cèl·lules iNKT analitzada per CBA a mostres d'individus (n=10). La secreció d'IL-13 és significativament més baixa a cèl·lules iNKT derivades de pacients amb T1D (T-student; $p=0,0164$).

Aquests dades es podien correlacionar amb l'expressió d'mRNA per IL-13 a mostres de pàncrees humà de controls i pacients amb T1D. En aquesta anàlisi es va observar una disminució de l'expressió d'aquesta citocina a pacients amb T1D al debut però sobretot al pacient amb T1D de llarga evolució (PanH#6046, 8 anys d'evolució) on l'mRNA d'IL-13 va ser indetectable per PCR convencional (Fig. 13).

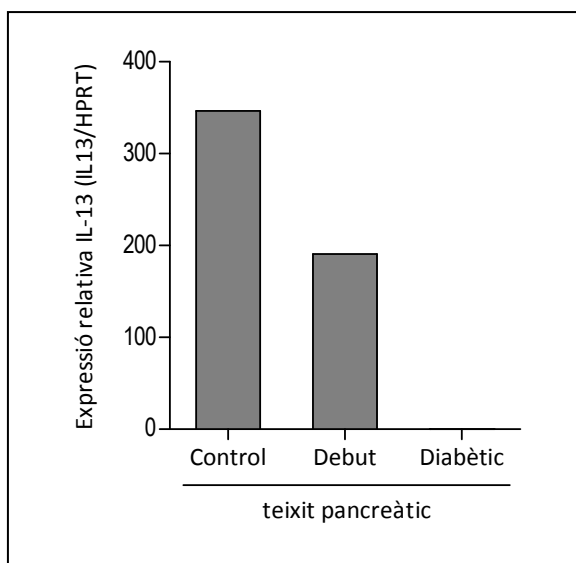


Figura 13. Expressió d'IL-13 a pàncrees humà a diferents etapes del desenvolupament de la T1D.

Anàlisi de l'expressió d'IL-13 per PCR convencional a mostres de pàncrees d'un individu control (n=1), d'un pacient al debut de la malaltia (n=1) i un diabètic de llarga evolució (n=1). La quantificació es va realitzar per anàlisi de densitometria de les bandes obtingudes calculant ràtio [IL13/HPRT].

Per a determinar si la IL-13 podria restaurar la funció supressora de les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D, es van afegir concentracions creixents d'IL-13 humana recombinant (rh-IL13) als cocultius de cèl·lules iNKT:Tef i es van mesurar canvis en el percentatge de supressió de la proliferació de cèl·lules Tef. Els resultats van indicar que l'addició de la rh-IL13 als cocultius va restaurar la supressió de la proliferació de les cèl·lules Tef de manera dosi dependent (Fig. 14).

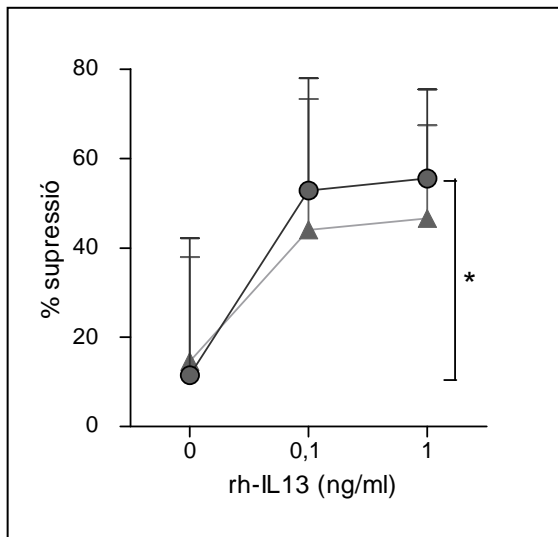


Figura 14. L'addició d'IL-13 humana recombinant restableix els nivells de supressió de les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D. Percentatge de supressió afegint concentracions creixents de rh-13 als cocultius de cèl·lules iNKT i Tef a ràtios iNKT:Tef de 0,5:1 (triangle) i 1:1 (cercle). La supressió és significativament més alta quan en afegir 1 ng/ml de rh-IL13 als cocultius de iNKT:Tef usant un ràtio 1:1 ($p=0,0286$).

Aquestes dades, confirmaven doncs, que la falta de supressió era deguda a una secreció deficient d'IL-13 i apuntaven cap a l'existència de defectes a la via de secreció o senyalització d'IL-13 com a responsables de la pèrdua de la capacitat reguladora de les cèl·lules iNKT derivades de pacients amb T1D al debut.

C1. 7 La qualitat de l'estímul determina la capacitat supressora de les cèl·lules iNKT

Les diferències a nivell de secreció de citocines per les cèl·lules iNKT pot dependre de diferents factors, entre ells, la qualitat de la senyalització via TCR. Per això, es va voler comparar la capacitat supressora de les cèl·lules iNKT, quan aquestes provenien de l'expansió *in vitro* amb un estímul específic de les cèl·lules iNKT i dependent per tant, de la senyalització via TCR com és l' α GalCer o bé de l'expansió amb un estímul policlonal no específic i independent de l'estimulació via TCR, com és la PHA-L.

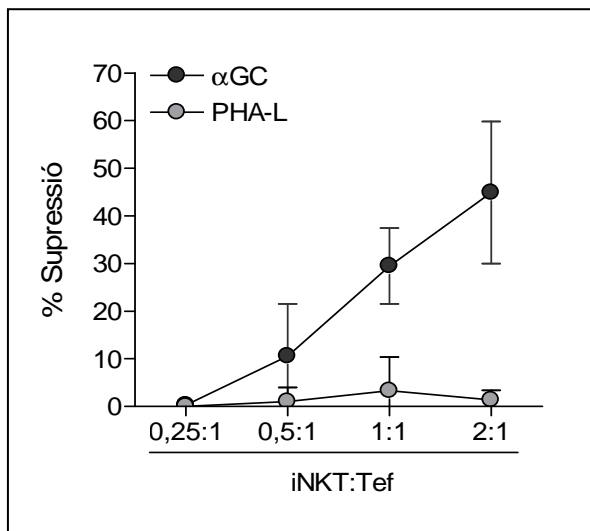


Figura 15. Les cèl·lules iNKT expandides *in vitro* amb PHA-L no tenen capacitat supressora. Comparació del percentatge de supressió que s'aconsegueix usant cèl·lules iNKT expandides *in vitro* amb PHA-L (cercles grisos) i cèl·lules expandides amb α GalCer, (cercles negres) . Les dades mostren un exemple dels quatre experiments realitzats.

Quan es va analitzar la capacitat de suprimir la proliferació de les cèl·lules Tef es va veure que les cèl·lules iNKT expandides amb PHA-L no suprimien la proliferació de les cèl·lules Tef, mentre que, tal i com havíem demostrat, les cèl·lules iNKT expandides amb α GalCer, del mateix individu, sí que ho feien (Fig. 15).

Aquest resultat indicaria que la qualitat de l'estímul, és a dir, la diferent senyalització intracel·lular quan l'activació és via el TCR o via el crosslinking dels receptors de membrana glicosil·lats, determina la capacitat reguladora de les cèl·lules iNKT.

C1.8 L'expansió de cèl·lules iNKT amb α GC o PHA-L determina diferències en el patró de secreció de citocines

Per determinar si l'expansió *in vitro* amb PHA-L, que donava lloc a la pèrdua de capacitat supressora de les cèl·lules iNKT, provocava un canvi en el patró de secreció de citocines per aquestes cèl·lules, respecte del patró de secreció amb l'expansió amb l'antigen α GalCer, es va quantificar la secreció de citocines proinflamatòries (IL-2, TNF α , INF γ , IL-17A i sCD40) i immunomoduladores (IL-4, IL-10 i IL-13) al sobrenedant del cultiu de cèl·lules iNKT expandides amb α GalCer i amb PHA-L. Els resultats d'aquests experiments (Fig. 16) van indicar que les cèl·lules iNKT expandides amb diferents estímuls mostraven un patró de secreció de citocines diferent. Així, les cèl·lules iNKT expandides amb PHA-L no disminueixen els nivells d'IL-2 al cultiu, dada corroborant amb el seu defecte a l'hora de suprimir la proliferació de les cèl·lules Tef (Fig. 14). A més a més, les cèl·lules expandides amb PHA-L van mostrar alts nivells de secreció de IL-17A, comparat amb els nivells observats a quan les cèl·lules iNKT eren

expandides amb α GalCer. En canvi, l'estimulació amb α GalCer augmentava els nivells de secreció de TNF α i IFN γ en els cocultius però no l'expansió amb PHA-L (Fig. 16). Respecte la secreció de citocines reguladores, la citocina més destacada va ser l'IL-13 (Fig. 16) secretada principalment per les cèl·lules iNKT expandides amb α GalCer mentre que les cèl·lules iNKT expandides *in vitro* amb PHA-L secretaven nivells significativament més baixos d'IL-13 (Fig. 17). Aquestes dades s'afegien a les ja descrites reafirmant el paper de la secreció d'IL-13 en la regulació per cèl·lules iNKT.

Per comprovar si els diferents nivells d'IL-13 detectats eren deguts a canvis en els percentatges de cèl·lules secretores d'IL-13 o bé degut a una disminució en el nivell de secreció de la citocina entre cèl·lules expandides amb α GalCer i/o PHA-L, es va determinar la producció d'IL-13 cèl·lula a cèl·lula mitjançant tinció intracel·lular i anàlisi per citometria de flux d'aquests dos tipus cel·lulars. La tinció intracel·lular per IL-13 va demostrar que la diferència venia donada per una disminució en el nivell de producció d'IL-13 en aquelles cèl·lules que havien estat expandides amb PHA-L, sense que això representés una disminució en el percentatge de cèl·lules productores d'IL-13 (Fig. 18).

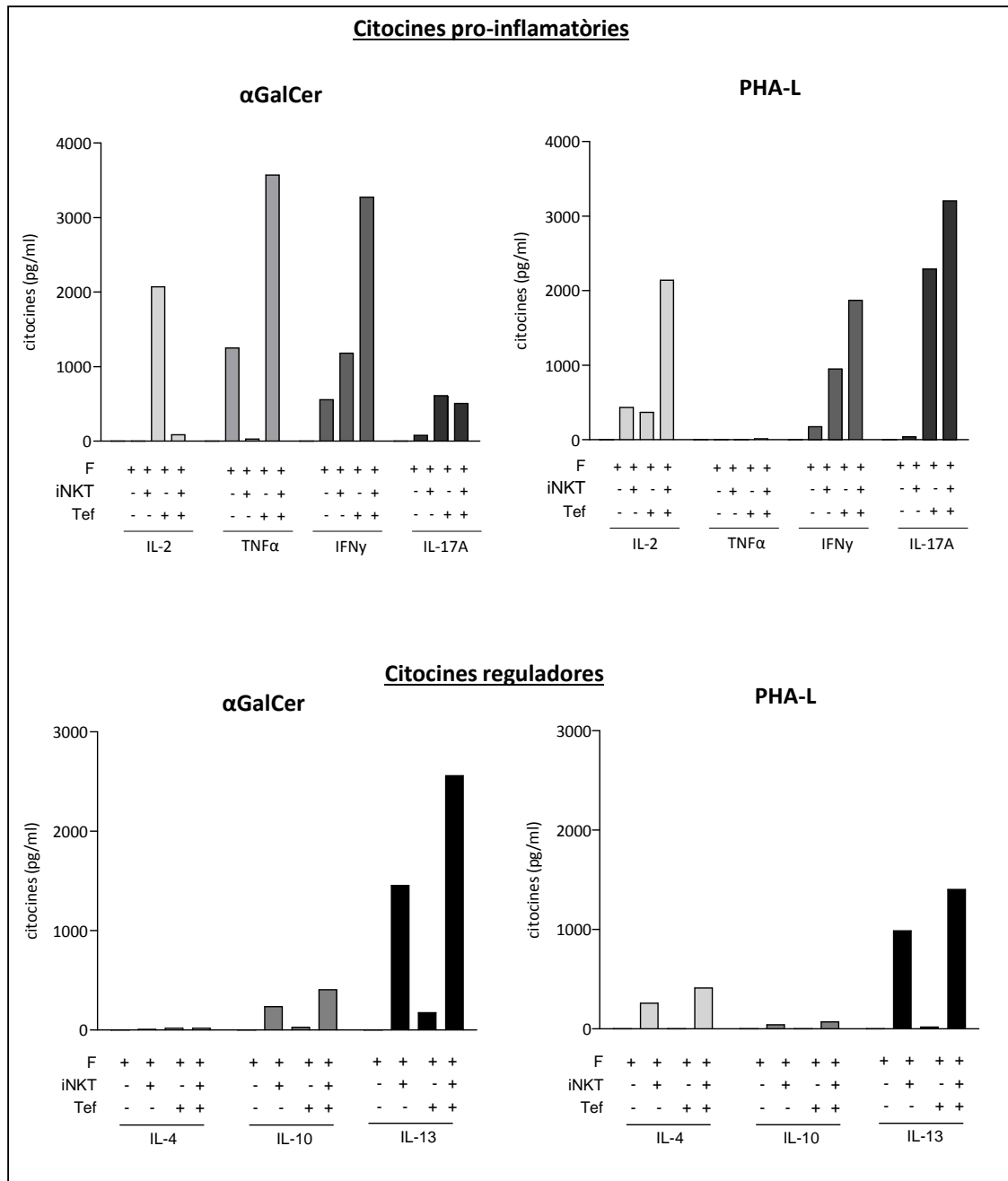


Figura 16. Quantificació de citocines pro-inflamatòries i immureguladores. En tots els casos, es va analitzar cada una de les citocines al cultiu de les feeders, de les cèl·lules iNKT, de les Tef i del cocultiu iNKT:Tef. Anàlisi per CBA als sobrenedants de 48h de cultiu.

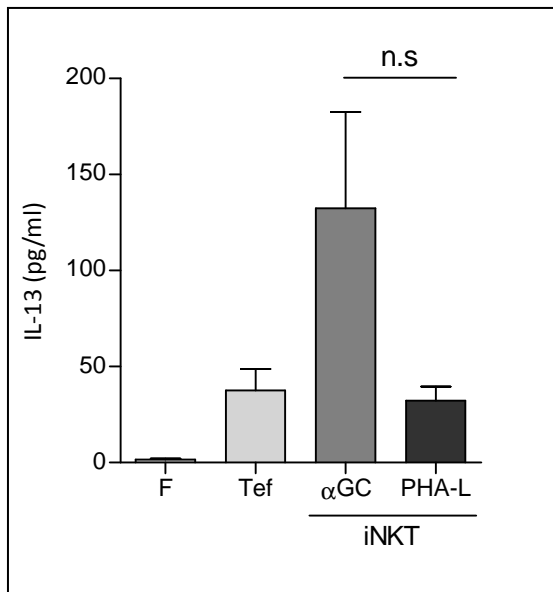


Figura 17. L'estímul utilitzat durant l'expansió *in vitro* de les cèl·lules iNKT, determina els nivells de secreció d'IL-13. La gràfica mostra la secreció d'IL-13 per cèl·lules iNKT expandides amb αGalCer i amb PHA-L. El gràfic mostra un exemple d'anàlisi de secreció d'IL-13 per CBA, de tots els experiments realitzats (n=8). Les dades analitzades per una T-student determinen que les diferències no són estadísticament significatives (p=0,057).

Degut a la relació que havíem demostrat entre supressió i nivells de secreció d'IL-13, ens vam fixar especialment en la secreció d'aquesta citocina. La quantificació de l'IL-13 va demostrar que les cèl·lules iNKT expandides *in vitro* amb PHA-L secretaven nivells significativament més baixos d'IL-13 que les cèl·lules expandides amb αGalCer. Aquestes dades s'afegien a les ja descrites, reafirmant el paper de la secreció d'IL-13 en la regulació per cèl·lules iNKT durant la seva funció supressora (Fig. 17).

Degut a la relació que havíem demostrat entre supressió i nivells de secreció d'IL-13, ens vam fixar especialment en la secreció d'aquesta citocina. La quantificació de la IL-13 va demostrar que les cèl·lules iNKT expandides *in vitro* amb PHA-L secretaven nivells significativament més baixos d'IL-13 que les cèl·lules expandides amb αGalCer. Aquestes dades s'afegien a les ja descrites reafirmant el paper de la secreció d'IL-13 en la regulació per cèl·lules iNKT durant la seva funció supressora (Fig. 17). Per comprovar si els diferents nivells d'IL-13 detectats eren deguts a canvis en els percentatges de cèl·lules secretores d'IL-13 o bé degut a una disminució en el nivell de secreció de la citocina entre cèl·lules expandides amb αGalCer i/o PHA-L, es va determinar la producció d'IL-13 cèl·lula a cèl·lula mitjançant una tinció intracel·lular i anàlisi per citometria de flux d'aquests dos tipus cel·lulars. La tinció intracel·lular per IL-13 va demostrar que la diferència venia donada per una disminució en el nivell de producció d'IL-13 en aquelles cèl·lules que havien estat expandides amb PHA-L, sense que això representés una disminució en el percentatge de cèl·lules productores d'IL-13 (Fig.18).

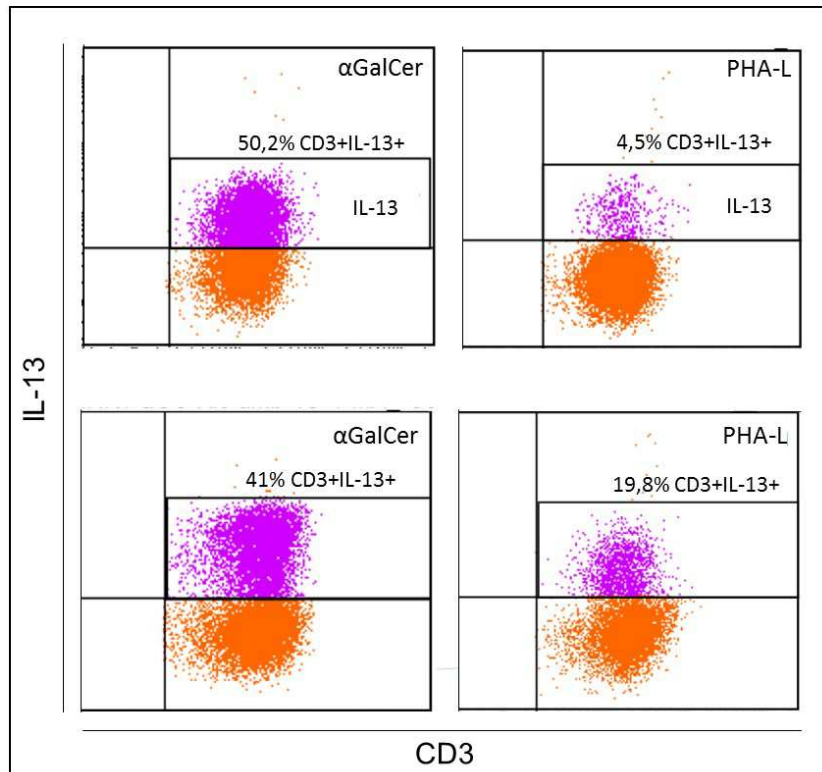


Figura 18. Producció d'IL-13 a cèl·lules iNKT expandides *in vitro* amb α GalCer o PHA-L. Determinació dels nivells d'IL-13 per tinció intracel·lular i anàlisi per citometria de flux. Els dot blots mostren dos exemples de totes les mostres analitzades (n=4).

C1. 9 La IL-13 actua directament sobre les cèl·lules Tef a través del seu receptor de membrana

Perquè la IL-13 pugui tenir un paper a la regulació de la proliferació de les cèl·lules Tef, aquestes han d'expressar el receptor de la IL-13. Fins fa poc, diferents estudis suggerien que les cèl·lules T no expressaven el receptor d'IL-13 i per tant, la IL-13 no podria fer cap efecte directe sobre les cèl·lules T, tot i així, més recentment alguns estudis si que han suggerit l'expressió del receptor d'IL-13 a cèl·lules T. A més a més, s'ha demostrat que la senyalització a través del receptor tipus 1 (IL13R α 1) indueix l'expressió del receptor de tipus 2 (IL13R α 2) [126]. Per tant, volíem comprovar si les cèl·lules Tef de controls i pacients expressaven els receptors de la IL-13.

Se'n va analitzar l'expressió per RT-PCR a cèl·lules Tef de controls i de pacients amb T1D. Les dades obtingudes van mostrar que ambdós receptors s'expressaven a les cèl·lules Tef però amb un patró d'expressió clarament diferent entre pacients i controls. Les cèl·lules Tef de pacients amb T1D van mostrar una major expressió de IL-13R α 1 en comparació amb les cèl·lules Tef dels controls. Contràriament, les cèl·lules Tef del pacients amb T1D expressaven nivells significativament menors d'IL-13R α 2

($p=0.0476$) que les cèl·lules Tef dels controls (Fig. 19a). Aquestes diferències no es van observar entre cèl·lules iNKT de pacients i controls (Fig. 19b).

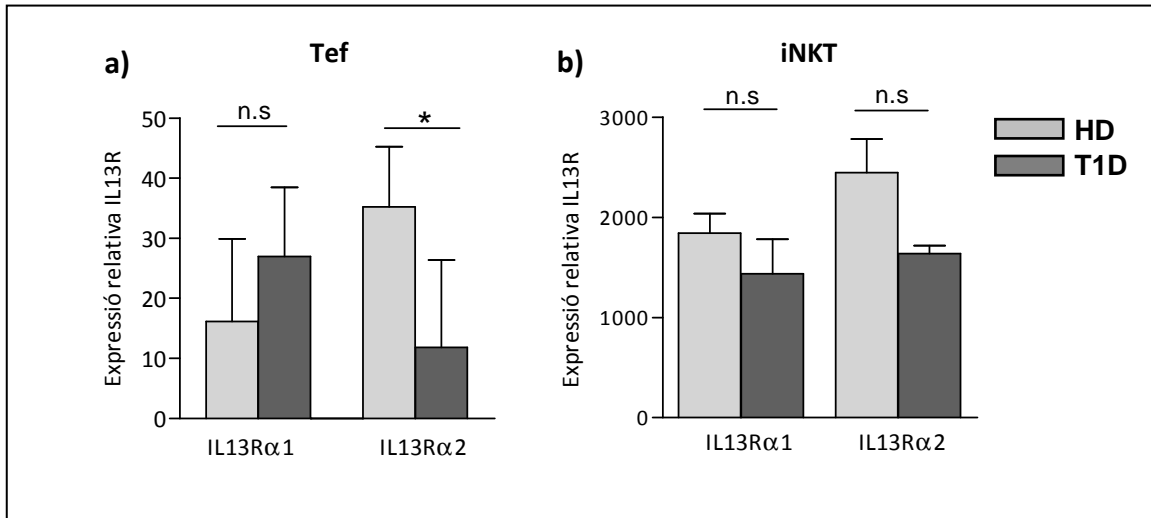


Figura: 19. Expressió relativa de receptor d'IL-13. Les gràfiques mostren l'expressió de IL13Rα1 i IL13Rα2 a cèl·lules Tef (a) i iNKT (b) d'individus sans ($n=4$) i de pacients amb T1D ($n=6$) analitzada per RT-PCR. El producte de la PCR es va córrer en un gel al 2% d'agarosa i és va quantificar l'expressió de IL13Rα1 i IL13Rα2 a individus controls (HD) (gris clar) i pacients amb T1D (gris fosc) per densitometria de les bandes obtingudes. Diferències en l'expressió de IL13Rα2 a cèl·lules Tef entre controls i pacients van ser estadísticament significatives ($p=0,0476$). No es van trobar diferències entre els dos receptors a les cèl·lules iNKT.

Aquests resultats demostraven que la IL-13 secretada per les cèl·lules iNKT realment podia exercir la seva funció unint-se directament al IL13R a la membrana de les cèl·lules Tef. A més, les diferències observades en el patró d'expressió dels dos tipus de receptor era un nou argument a favor que alteracions a la via de secreció de l'IL-13 eren responsables de la deficiència reguladora de les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D a debut.

C1. 10 Diferents anàlegs de l'αGalCer tenen capacitat per activar a les cèl·lules iNKT

Considerant la possible aplicació immunoterapèutica del paper regulador de les cèl·lules iNKT mitjançant la secreció d'IL-13, es va pensar en la possibilitat d'augmentar la secreció d'aquesta citocina per cèl·lules iNKT i així potenciar la seva funció reguladora. L'αGalCer és un glicoesfingolípid presentat per CD1d que és un potent activador de les cèl·lules iNKT. La identificació de diferents anàlegs del l'αGalCer amb l'habilitat d'induir una resposta predominant de tipus Th1 i/o Th2 i s'està investigant la possibilitat de poder utilitzar-los com a moduladors de la resposta immunitària . L'activació de les cèl·lules iNKT no només depèn de quin antígen és reconegut, sinó que la seva estructura determinarà de quina manera és reconegut pel TCR i per tant l'afinitat de la interacció entre TCR-antigen-CD1d i la cinètica de presentació per les molècules de CD1d. Diferents estudis, han suggerit que una interacció de baixa afinitat entre TCR-Ag lípidic-CD1d induïx una secreció de citocines de tipus Th1, contràriament, una interacció d'alta afinitat, induïx una secreció de citocines reguladores [9, 132] . En el cas de l'antigen sintètic de l'αGalCer, anomenat KNR7000, es considera un antígen d'afinitat intermitja perquè provoca la secreció tant de citocines de tipus Th1 com Th2.

Per tant, per continuar amb els estudis del paper regulador de l'IL-13, es va pensar en la possibilitat d'usar diferents anàlegs lipídics (n=8) d'estructura similar a l'αGalCer, reconeguts i presentats per molècules de CD1d, amb la finalitat de trobar glicoesfingolípid que poguessin potenciar la secreció d'IL-13 per part de les cèl·lules iNKT. Estudis realitzats per *Rossjohn et al.* van demostrar que hi havia 8 anàlegs que activaven cèl·lules iNKT de ratolins però amb diferent potència. Així es van classificar en anàlegs dèbils, de potència intermitja i de potència forta. Per tant, es van estimular cèl·lules iNKT humanes amb els diferents anàlegs de l'αGalCer i es va analitzar si activaven cèl·lules iNKT humanes mesurant la secreció de TNFα per Elisa.

Els resultats obtinguts van mostrar que els diferents anàlegs de l'αGalCer també podien activar cèl·lules iNKT humanes, ja que en tots els casos es va detectar secreció de TNFα d'una manera dosi dependent (Fig. 20). Només 1 dels 8 anàlegs analitzats (anàleg 1), va induir uns nivells de secreció de TNFα similars als induïts per l'αGalCer, la resta d'anàlegs induïa una secreció de TNFα menor. Com a control negatiu de l'experiment, es va analitzar la secreció de TNFα als sobrenedants de cèl·lules Tef, i per tant no restringides per CD1d, activades amb els anàlegs. Com era d'esperar, les cèl·lules Tef no van respondre a l'estimulació amb els diferents anàlegs de l'αGalCer i per tant, es van detectar nivells de TNFα similars als de les cèl·lules Tef sense estímulo.

(Fig. 20). Per tant, amb aquests resultats, podem dir, que la resposta als anàlegs era específica de cèl·lules iNKT.

Quan es va comparar la secreció de TNF α amb la produïda per cèl·lules iNKT de pacients amb T1D, en resposta a l'estimulació amb els diferents anàlegs, es va veure que les cèl·lules iNKT dels pacients amb T1D responien als diferents anàlegs de l' α GalCer tot i que més dèbilment que les cèl·lules iNKT de donants sans (HD). La resposta a l'estimulació amb antiCD3/CD28, usada com a control positiu de l'experiment va ser similar en tots els casos (Fig. 20).

Quan es va comparar la secreció de TNF α per cèl·lules iNKT d'individus sans amb la de pacients amb T1D, en resposta a l'estimulació amb els diferents anàlegs, es va veure que les cèl·lules iNKT dels pacients amb T1D responien als diferents anàlegs de l' α GalCer tot i que més dèbilment que les cèl·lules iNKT de donants sans (HD). La resposta a l'estimulació amb antiCD3/CD28, usada com a control positiu de l'experiment, en canvi, va ser similar en tots els casos (Fig. 21).

A més de la secreció de TNF α , que ens dóna una idea de l'activació de les cèl·lules iNKT. També es va mesurar la secreció d'IFN γ com a prototip de citocina pro-inflamatòria.

Els resultats van mostrar que en general, la secreció d'IFN γ era baixa, tant la secretada per cèl·lules iNKT d'individus sans com la de pacients amb T1D. Només es va observar, que alguns dels anàlegs (anàlegs de l'1-4) eren lleugerament més potents que l'estimulació amb l' α GalCer.

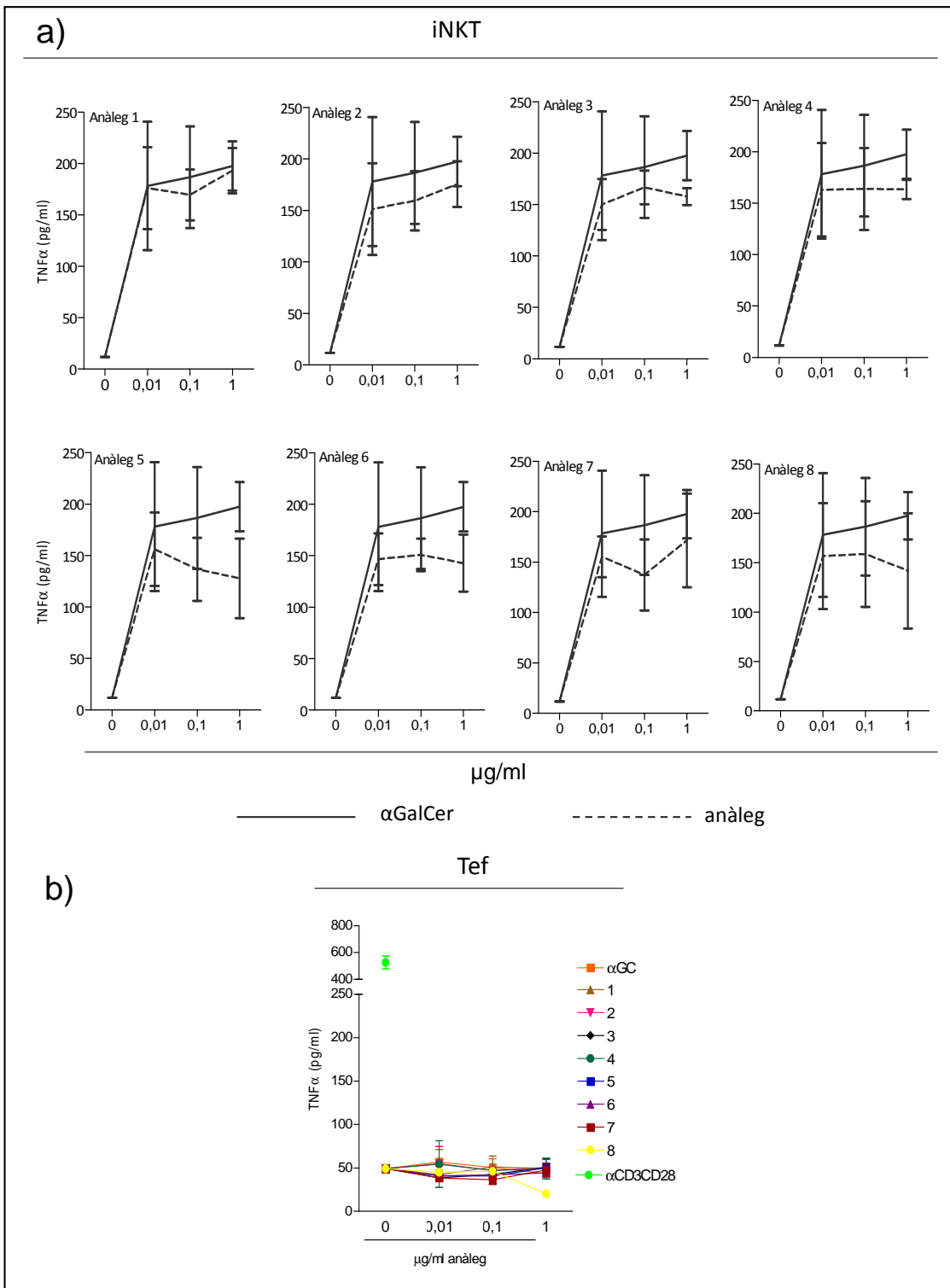


Figura 20. Activació de les cèl·lules iNKT de controls sans amb anàlegs de l'αGalCer. (a) Secreció de TNFα produïda per l'activació de cèl·lules iNKT. Comparació de la secreció de TNFα de cèl·lules iNKT en resposta a l'αGalCer (ratlla continua) i amb cada un dels anàlegs (ratlla discontinua). El gràfic mostra la mitjana de tots els experiments realitzats (n=3). **(b)** Secreció de TNFα per cèl·lules Tef, usades com a control negatiu de l'experiment.

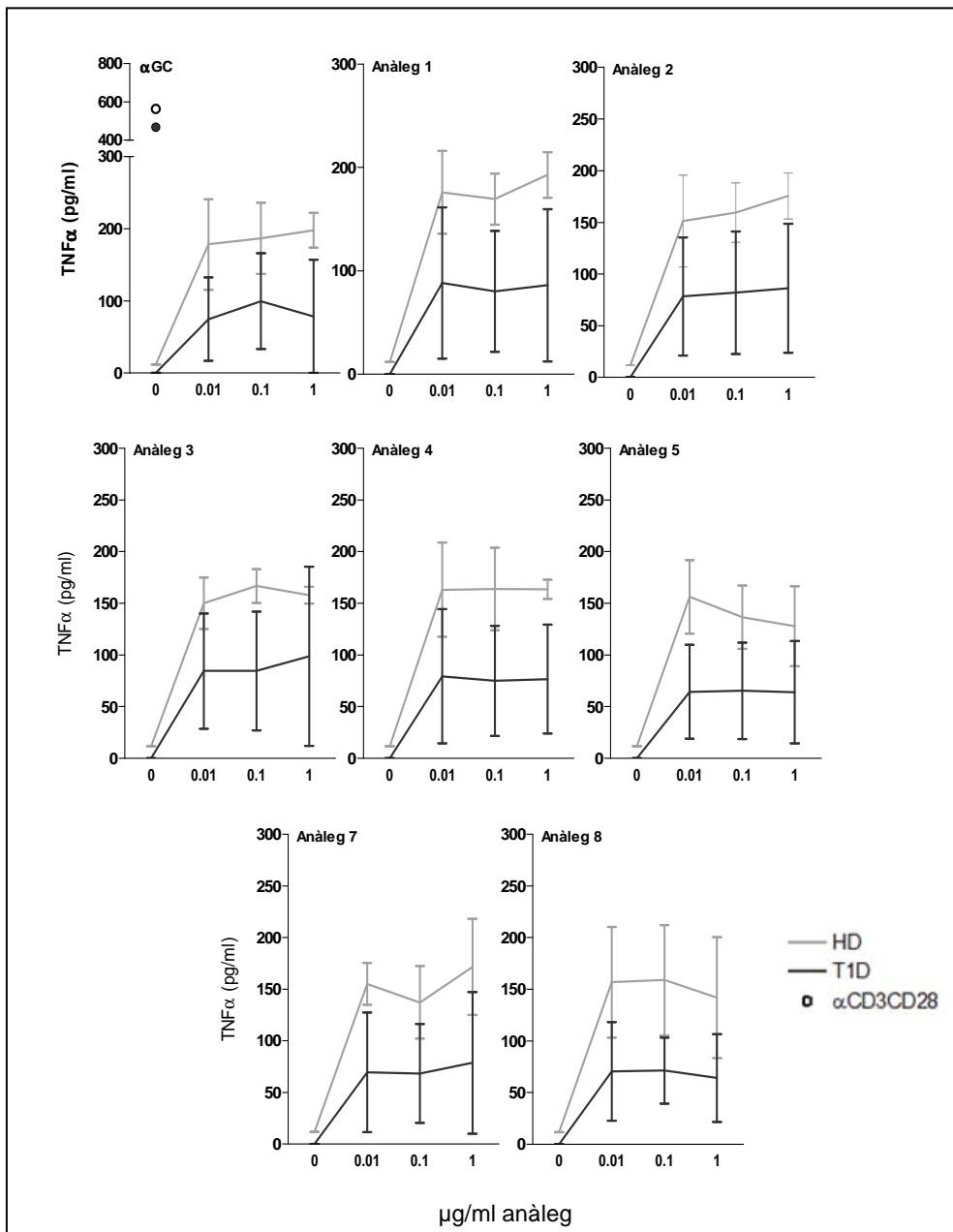


Figura 21. Comparació de la secreció de TNF α en resposta als diferents anàlegs per cèl·lules iNKT de controls sans i de pacients amb T1D al debut. Les gràfiques mostren la concentració de TNF α (pg/ml) al sobredant de cultius de cèl·lules iNKT de donants sans (ratlla gris clar) i de pacients amb T1D al debut (ratlla gris fosc) després de l'estimulació amb cada un dels anàlegs d' α GalCer. Control positiu (gràfica 1), estimulació amb α CD3/28 de les cèl·lules iNKT de controls (cercle gris clar) i de pacients amb T1D (cercle gris fosc). La gràfica mostra les dades de tots els experiments realitzats per triplicat per a cada una de les mostres; HD (n=3) i T1D (n=3).

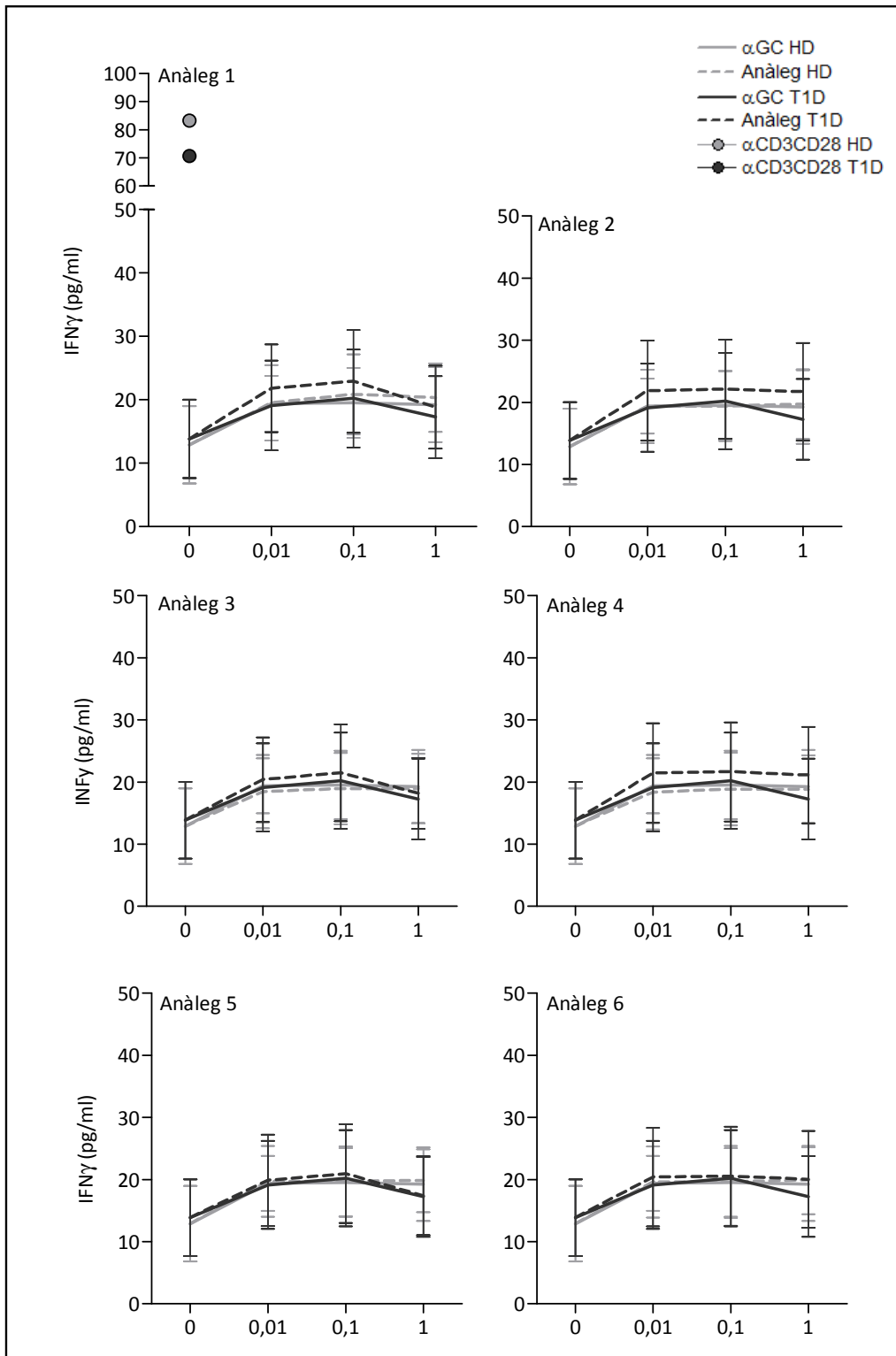


Figura 22. Comparació de la secreció d'IFN γ per cèl·lules iNKT de controls i pacients amb T1D al debut en resposta als diferents anàlegs. Les gràfiques mostren la concentració de IFN γ (pg/ml) al sobrenadant de cultius de cèl·lules iNKT de donants sans (ratlles gris clar) i de pacients amb T1D al debut (ratlles gris fosc) després de l'estimulació amb d' α GalCer (ratlles contínues) i/o amb cada un dels anàlegs (ratlles discontinues). Control positiu, estimulació amb α CD3/28 de les cèl·lules iNKT de controls (cercle gris clar) i pacients amb T1D (cercle gris fosc) (gràfica 1). Les gràfiques mostren les dades de tots els experiments realitzats per triplicat per a cada una de les mostres; HD (n=3) i T1D (n=3).

C1. 11 Les cèl·lules iNKT secreten IL-13 en resposta als anàlegs de l' α GalCer

Es volia veure si l'activació de les cèl·lules iNKT amb aquests anàlegs podia afavorir la secreció d'IL-13. Així es va analitzar la secreció d'IL-13 en els sobredants de l'estimulació de cèl·lules iNKT de controls sans amb cada un d'aquests compostos. Aquesta anàlisi va mostrar que les cèl·lules iNKT de controls sans secretaven IL-13 en resposta a l'estimulació amb els anàlegs (Fig. 23). Dels 8 anàlegs testats, 4 (anàleg 1, 4, 5 i 8) on s'indueix uns nivells de secreció d'IL-13 superiors als secretats per l'activació amb α GalCer en algunes de les concentracions utilitzades. La resta (anàleg 2, 3, 6 i 7), estaven lleugerament per sota.

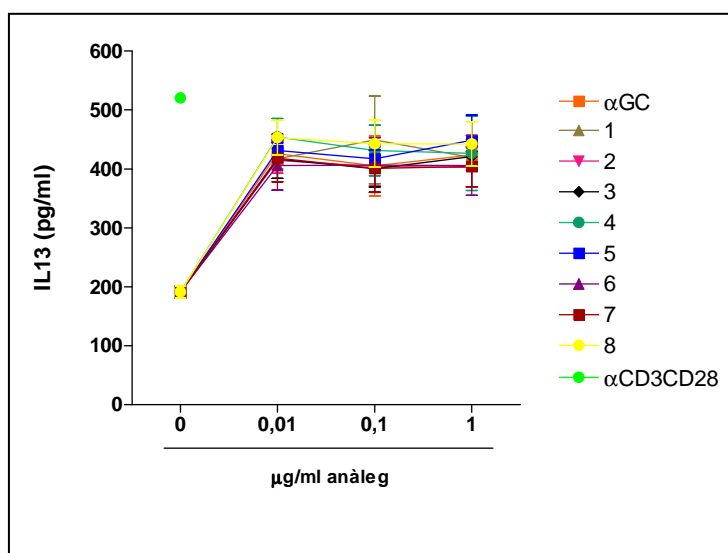


Figura 23. Les cèl·lules iNKT de controls sans secreten IL-13 en resposta als anàlegs de l' α GalCer. Com a control positiu, les cèl·lules iNKT es van estimular amb beads conjugades amb anti-CD3CD28. Les dades representen la mitjana de tots els experiments realitzats (n=3).

La demostració que les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D al debut tenien una deficient capacitat supressora de les cèl·lules Tef i que això correlacionava amb nivells baixos de secreció d'IL-13, es va voler analitzar si alguns d'aquests anàlegs d' α GalCer, afavoria la secreció de nivells més alts d'IL-13 per cèl·lules iNKT dels pacients amb T1D. Els resultats van mostrar que, si comparem la secreció d'IL-13 produïda per l'activació de l' α GalCer amb la produïda en resposta a l'estimulació de cada un dels anàlegs a controls sans (HD) i a pacients amb T1D, podem observar que a controls sans la majoria dels anàlegs no van potenciar més la secreció d'IL-13, a excepció de l'anàleg número 8. Els resultats van mostrar que contràriament al que passava amb les cèl·lules iNKT de controls sans, a pacients amb T1D, 4 dels 8 anàlegs analitzats (anàlegs de l'1-4) van augmentar els nivells de secreció d'IL-13 en comparació amb la secreció en resposta a l'activació per l' α GalCer (Fig. 24).

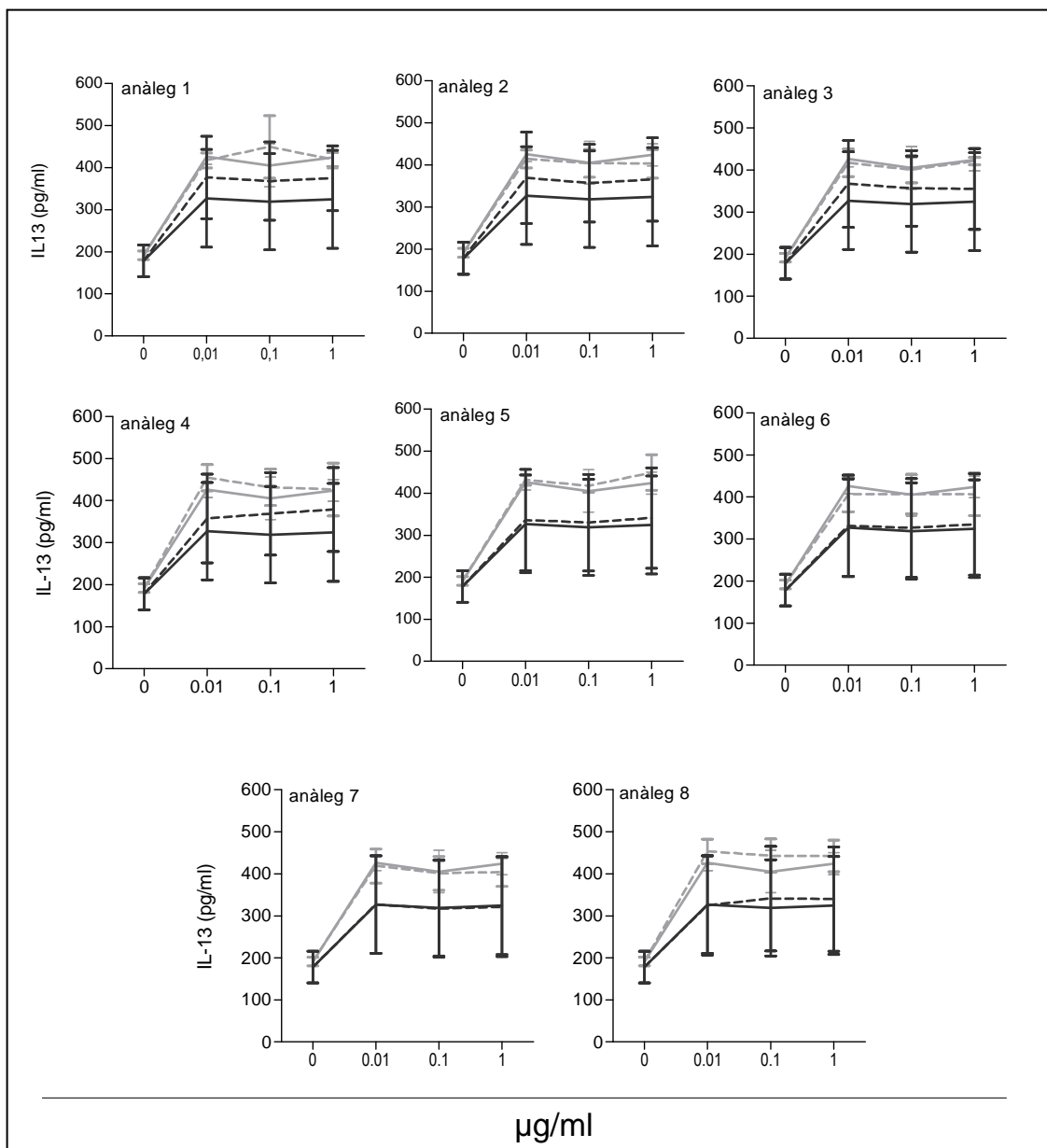


Figura 24. Alguns anàlegs d'αGalCer afavoreixen la secreció d'IL-13 per cèl·lules iNKT de pacients amb T1D. La gràfica mostra la secreció d'IL-13 per cèl·lules iNKT d'individus sans (ratlla gris clara) i pacients amb T1D (ratlla gris fosca) estimulades amb αGalCer o amb els diferents anàlegs (HD, ratlla discontinua gris clar; T1D, ratlla discontinua gris fosca). Quantificació per CBA i anàlisi per citometria de flux. Les dades mostren la mitjana de les mostres analitzades tant per controls com per pacients amb T1D (n=3).

Aquestes dades indicaven que compostos d'estructura similar a l'αGalCer no només activaven les cèl·lules iNKT, tant d'individus sans com de pacients amb T1D, sinó que alguns dels compostos afavorien la secreció d'IL-13 per cèl·lules iNKT de pacients amb T1D. Aquest és un resultat molt interessant perquè hauria de permetre l'ús d'aquests anàlegs de l'αGalCer com a teràpia per augmentar l'efecte supressor de les cèl·lules iNKT a pacients amb T1D i intentar així regular la resposta autoimmunitària contra les cèl·lules β pancreàtiques.

Discussió Capítol 1

La funció efectora de les cèl·lules iNKT ha estat àmpliament estudiada a la resposta contra patògens. Hi ha poques dades sobre la possible funció reguladora de les cèl·lules iNKT i les que hi ha són majoritàriament en models de ratolí. Estudis en ratolins, havien descrit que l'alteració de la freqüència i/o de la funcionalitat d'aquestes cèl·lules era responsable del desenvolupament de malalties autoimmunitàries. Els estudis realitzats específicament en ratolins NOD, havien demostrat que tant defectes funcionals com una reducció en la freqüència de cèl·lules iNKT podien contribuir al desenvolupament de la diabetis tipus 1 [28, 149]. Així, diversos estudis demostraven que restablint el número de cèl·lules iNKT es reduïa la incidència de la T1D i fins i tot, s'alentia la seva progressió [30,81]. Aquestes alteracions de la freqüència han estat menys consistents en els treballs amb cèl·lules iNKT humanes on alguns estudis havien documentat una disminució, d'altres un increment o fins i tot, uns altres una freqüència normal de cèl·lules iNKT-CD4⁺ a pacients amb T1D. Per tant, encara actualment, no hi ha un veritable consens sobre els seus efectes en la susceptibilitat a la malaltia [150].

Aquest treball tenia doncs com objectiu, estudiar si les cèl·lules iNKT humanes podien suprimir la resposta T autoreactiva en el context de la diabetis tipus 1, específicament al debut clínic de la malaltia. Aquest és l'estadi més primerenc en el qual es poden fer aquests estudis en humans i per tant, possiblement el més proper al punt de trencament de l'homeòstasi del teixit. La intervenció de les cèl·lules reguladores en aquest punt pot ser determinant per evitar el desenvolupament de la T1D.

Les cèl·lules iNKT activades per glicolípid, produeixen grans quantitats de citocines tant de tipus Th1 como de tipus Th2 i tenen la funció d'interaccionar amb d'altres tipus cel·lulars, per tant, poden regular la resposta en condicions de malaltia. La demostració que cèl·lules iNKT conferien protecció al desenvolupament de la diabetis a ratolins NOD va afavorir la realització d'estudis per esbrinar el/s mecanisme/s mitjançant els quals, les cèl·lules iNKT suprimien l'autoreactivitat, però encara no hi ha consens en el mecanisme responsable.

Aquest estudi ha demostrat primer que les cèl·lules iNKT de sang perifèrica d'individus sans, tant *ex vivo* com després de l'expansió *in vitro* amb α GalCer, tenen capacitat per a suprimir la proliferació de cèl·lules Tef CD4⁺ autòlogues, independentment de la seva especificitat antigènica. Les cèl·lules iNKT expandides *in vitro* amb α GalCer suprimien de manera depenent de dosi del número de cèl·lules i tenien una major capacitat de supressió que les cèl·lules iNKT *ex vivo*. Aquesta diferència era possiblement deguda al major grau de puresa de la població cel·lular comparat amb el de les cèl·lules iNKT *ex vivo*.

A més, les cèl·lules iNKT expandides *in vitro* també eren més homogènies quan a l'estat de repòs al moment de començar l'assaig de supressió i per tant, van generar una resposta més robusta. D'altra banda, l'expansió *in vitro* de les cèl·lules iNKT era necessària perquè la seva freqüència a sang perifèrica a humans és relativament baixa, entre el 0,1-0,3% de les cèl·lules T totals.

Els estudis van mostrar que les cèl·lules iNKT suprimien més eficientment cèl·lules T naive en repòs que cèl·lules T memòria i/o cèl·lules Tef expandides *in vitro*. Aquestes dades concordaven amb estudis publicats prèviament on es proposava que les cèl·lules iNKT de ratolí suprimien preferentment l'activació de cèl·lules T naive, suggerint que aquestes actuaven impedit la diferenciació de cèl·lules T CD4⁺ a cèl·lules Tef. Fins i tot, les cèl·lules iNKT, inhibien la diferenciació i proliferació del clon BDC2.5 de cèl·lules T diabetogèniques [148, 149]. Contràriament a les dades observades a controls, aquestes dades contrasten amb els resultats obtinguts a pacients amb T1D, on es mostra que les seves cèl·lules iNKT no tenien capacitat supressora de la proliferació de cèl·lules Tef autòlogues. Diferents estudis han mostrat defectes funcionals i una freqüència reduïda de cèl·lules iNKT en ratolins NOD que contribueix a la susceptibilitat del desenvolupament de la T1D [28,149]. Aquests estudis demostraven que restaurant la quantitat de cèl·lules iNKT per transferència adoptiva de cèl·lules V α 14J α 18, transgènesi o el tractament amb α GalCer, es reduïa la incidència de la T1D o alentia la seva progressió [30,66,81,152]. A pacients amb T1D molts estudis han assenyalat la baixa freqüència de cèl·lules iNKT-CD4⁺ tot i que no s'ha vist un consens en els seus efectes sobre la susceptibilitat a la T1D [153]. Tot i així, els nostres estudis van mostrar que les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D tenien un defecte funcional, ja que elles no podien regular les cèl·lules Tef ja fossin cèl·lules Tef autòlogues o al·logèniques derivades de donants sans o pacients amb T1D. Al revés, les cèl·lules iNKT de controls sans podien suprimir tant les cèl·lules Tef autòlogues com les al·logèniques tant de d'individus sans com de pacients amb T1D, sent més eficient la supressió de cèl·lules Tef autòlogues. Per tant, la regulació alterada de les cèl·lules Tef detectada en el nostre estudi no es deu a la seva resistència a ser suprimida com s'ha proposat per a la regulació mediada per cèl·lules Treg [154], sinó a defectes intrínsecs en les cèl·lules iNKT de pacients T1D.

El fet que la supressió de les cèl·lules Tef per cèl·lules iNKT a humans no requereís el contacte cèl·lula-cèl·lula, contrastava amb el mecanisme de supressió descrit per cèl·lules Treg, on diversos estudis havien mostrat la necessitat del contacte cel·lular [155, 156]. En aquest estudi, s'ha demostrat que el mecanisme principal de supressió per cèl·lules iNKT, depèn de la secreció de factors solubles, en concret d'IL-13. Les cèl·lules iNKT són una font important d'IL-13, però contràriament al que s'ha observat a individus sans, a les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D s'ha demostrat una clara

reducció de la secreció d'IL-13, la qual cosa podria explicar la seva discapacitat funcional. Estudis previs, havien descrit una menor concentració d'IL-13 al sèrum de nens al debut de la T1D i a familiars amb alt risc de contraure la malaltia [157,159]. L'origen de la deficiència no s'ha trobat, però els resultats presentats aquí, permeten pensar que la producció deficient d'IL-13 per part de les cèl·lules iNKT pot ser determinant en la reducció dels nivells sèrics d'IL-13 al debut de la T1D. La baixa secreció d'IL-13 podria ser deguda a factors genètics propis de la T1D, a factors intrínsecs de les cèl·lules iNKT o bé factors relacionats amb l'entorn al pàncrees. S'ha descrit l'existència de polimorfismes o fins i tot de combinacions de genotips del receptor de la IL-4, de la IL-4 i de la IL-13 que confereixen susceptibilitat al desenvolupament de la T1D en poblacions específiques de pacients, degut possiblement a un efecte en el balanç de la resposta Th1/Th2 influenciant molts aspectes a nivell de regulació, de la homeòstasi i de l'activació de cèl·lules Th1 i Th2, i fins i tot de cèl·lules T reguladores [159,160] però, tot i així, el nombre de mostres estudiades és baix com per arribar a una conclusió.

D'altra banda, previs estudis van mostrar que ratolins deficients d'IL-13 inhibien el desenvolupament de certs llinatges de cèl·lules T amb una conseqüent reducció en la secreció de citocines de tipus Th2 [161] i una disminució en la resposta humoral [162]. Aquests resultats van ser consistents amb previs resultats on s'havia vist que usant anticossos policlonals anti-IL13, usats per a bloquejar la funció de la IL-13, resultava en una significant reducció de la secreció d'IL-4 secretada per cèl·lules T [162]. Estudis més recents usant ratolins KO per IL-13 en models animals experimentals de miocarditis autoimmune, van suggerir que l'absència d'IL-13 resultava en una severa i greu miocarditis autoimmune, associada a un increment en la infiltració de limfòcits i d'altres tipus de cèl·lules del sistema immunitari al cor. A més a més, l'absència d'IL-13 en aquest model experimental va estar associada a una reducció en l'expansió e inducció de cèl·lules Treg [163].

La secreció de citocines per cèl·lules iNKT depèn de les condicions d'activació, és a dir, el tipus i durada de l'estímul, així com el tipus i l'estructura de l'antigen reconegut [164]. Diversos estudis demostren, que modificacions en la llargada de la cadena d'àcids grassos de l' α -GalCer és un factor determinant molt important a l'hora de determinar el tipus de resposta [165]. Reduir la llargada de les cadenes d'àcids grassos de l' α GalCer augmenta la taxa de dissociació del lípid unit a CD1d així com l'estabilitat d'unió. Les modificacions en la llargada dels àcids grassos poden modular l'afinitat pel TCR, la formació de sinapsis estables i/o inestables i l'activació dels limfòcits [132]. Aquestes modificacions no són les úniques que poden afectar a la resposta de les cèl·lules T, ja que diferents estudis han suggerit que la saturació o

insaturació de les cadenes d'àcids grassos també poden promoure canvis a nivell de resposta de cèl·lules T, així com canvis en la secreció de citocines [166, 167].

El fet que les cèl·lules iNKT neonatals expressin un fenotip de memòria activat (CD62L CD45RO CD25) [168] i que les cèl·lules iNKT d'adults continguin transcripts preformats d'IFN γ i IL-4 [169], ha suggerit que les cèl·lules iNKT són preactivades per lligands endògens, que haurien de transmetre un senyal relativament feble via el TCR [93]. S'ha proposat que una estimulació feble via el TCR, afavoreix la secreció de citocines de tipus Th2, és a dir, IL-5 i IL-13 [1]. Per tant, les diferències en els nivells de secreció d'IL-13 per cèl·lules iNKT d'individus sans i de pacients amb T1D es podria explicar per canvis en la qualitat de la senyalització via TCR o la integració de senyals des de diferents receptors de membrana. En aquest context, s'ha demostrat que quan les cèl·lules iNKT s'expandien *in vitro* amb el mitogen fitohemaglutinina (PHA-L), un estímul policlonal i inespecífic, les cèl·lules iNKT d'individus sans perdien la capacitat de supressió. Aquesta pèrdua de la funció reguladora, a més, correlacionava directament amb una disminució de la secreció d'IL-13, suggerint que una alteració en la senyalització via TCR a cèl·lules iNKT de pacients amb T1D podia estar al darrera de la pèrdua de la funció reguladora d'aquestes cèl·lules. L'estimulació amb PHA redueix l'expressió del mRNA que codifica per la IL-4 que fa baixar el ràtio de mRNA IFN γ /IL-4 comparat amb la estimulació amb l' α GalCer [170]. Per tant, la PHA-L indueix un canvi en el patró de secreció de citocines afavorint la producció de citocines de tipus Th1. Aquestes dades podrien explicar perquè les cèl·lules iNKT expandides *in vitro* amb PHA-L perden la seva capacitat supressora. La pèrdua de la funció supressora amb l'expansió amb PHA-L també es podria deure a diferències entre la senyalització via el TCR i la PHA-L [171]. Aquest mitogen s'uneix específicament a β -1,6-N-acetylglucosamina (GlcNAc) ramificats en tri-tetra N-glycans i s'ha demostrat que si es produeixen canvis en aquests lligands s'altera la senyalització intercel·lular. Es podria hipotetitzar, que un canvi en la glicosil·lació de les proteïnes de membrana plasmàtica de les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D podria alterar la resposta en aquests pacients. A favor d'aquesta possibilitat, hi ha els estudis en ratolins que han demostrat que la variabilitat en l'expressió d'N-glicans ramificats en GlcNAc específicament a cèl·lules T, regula la seva funció i la susceptibilitat a malalties autoimmunitàries desmielinitzants [172,173]. Per aclarir aquest efecte s'ha plantejat l'anàlisi de microarrays per comparar l'expressió gènica a cèl·lules iNKT expandides *in vitro* amb α GalCer o amb PHA-L. Aquest estudi, junt amb experiments de fosfoproteòmica que analitzin la via de senyalització d'IL-13 haurien de permetre la dissecció del mecanisme darrera l'efecte de la IL-13 en la regulació cel·lular.

Finalment, les característiques de la cèl·lula presentadora d'antigen són també determinants pel tipus de resposta obtinguda. Cada tipus de cèl·lula presentadora d'antigen pot presentar diferents antígens endògens a les cèl·lules T els quals poden ser modificats de forma diferent per la resposta inflamatòria produïda durant la T1D. Així, depenent la cèl·lula presentadora d'antigen considerada y les modificacions de l'estructura dels lípids endògens, es podria impedir l'expansió de subgrups determinats de cèl·lules iNKT reguladores *in vivo* a la T1D i així, es potenciarà la destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques.

A part de factors intrínsecs de les cèl·lules iNKT, cal tenir en compte també que l'entorn de citocines al teixit en un moment determinat pot modular la funcionalitat d'aquestes cèl·lules. Corroborà aquest punt, els resultats dels assajos de supressió amb cèl·lules iNKT de pacients amb T1D que havien estat prèviament estimulades en presència d'IL-13. Aquestes cèl·lules, sorprenentment, recuperaven la capacitat reguladora assolint uns nivells de supressió de les cèl·lules Tef semblants als de les cèl·lules iNKT de controls sans. El resultat suggeriria que la deficiència funcional de les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D podia ser el resultat de factors extrínsecs a la mateixa cèl·lula, entre ells, l'entorn de citocines que determinés la disminució en la producció d'IL-13.

En aquest context és important tenir en compte que l'enterovirus Cocksackievirus-B4 ha estat considerat un agent etiològic de la T1D ja que s'ha demostrat que provoca alteracions funcionals i danys a les cèl·lules β pancreàtiques [174]. S'ha demostrat també que la infecció d'illots pancreàtics humans amb Cocksackie B4 causa una disminució de la secreció d'IL-13 [175]. A més, l'IFN α que és secretat per les cèl·lules β en resposta a la infecció, accelera el desenvolupament de la diabetis [176] i incrementa la síntesi d'IL-4 alhora que redueix la producció d'IL-13 [177]. Totes aquestes dades, suggereixen que les alteracions provocades per l'enterovirus podrien portar a una supressió deficient de les cèl·lules Tef per part de les cèl·lules iNKT i a la conseqüent pèrdua de cèl·lules β pancreàtiques. A més, la IL-13 té efectes protectors sobre les cèl·lules β pancreàtiques, ja que s'ha demostrat que manté la seva viabilitat després del tractament d'aquestes amb diversos agents citotòxics [178]. No sorprèn doncs, que l'administració d'IL-13 recombinant a ratolins NOD impedeixi el desenvolupament de la diabetis conferint protecció a llarg termini quan s'administren varies dosis [179]. Per tant, la IL-13 sembla ser una citocina de vital importància en la patogènesi de la diabetis i una reducció en la secreció al debut de la T1D podrien contribuir a la desregulació final de l'atac autoimmunitari facilitant la destrucció de les cèl·lules β .

Perquè la IL-13 secretada per les cèl·lules iNKT tingui un efecte sobre la proliferació de les cèl·lules Tef, aquestes haurien d'expressar el receptor d'aquesta citocina. Estudis previs, havien indicat que les cèl·lules T humanes no expressaven el receptor de la IL-13, el que suggeria que l'efecte d'aquesta sobre les cèl·lules Tef tenia lloc a través de les APCs que expressaven el receptor d'IL-13 [180]. Els resultats presentats aquí, en canvi, demostren l'expressió de mRNA dels dos tipus de receptors, IL13R α 1, considerat el receptor de baixa afinitat i IL13R α 2, el d'alta afinitat, a cèl·lules Tef d'individus sans i cèl·lules de pacients amb T1D. L'expressió d'aquests dos receptors a les cèl·lules Tef, indica que la secreció d'IL-13 per les cèl·lules iNKT podria exercir el seu efecte supressor directament sobre les cèl·lules Tef. Per tant, tant aquests resultats com els d'altres estudis, donen suport al paper de la transducció de senyals via aquests receptors a les cèl·lules Tef que induirien canvis en el patró d'expressió gènica i en les seves funcions efectores [181,182,183]. Tot i així, les nostres dades mostren que l'expressió dels receptors de la IL-13 és diferent a cèl·lules Tef de diabètics i controls sans. L'augment de l'expressió del IL13R α 1 a cèl·lules Tef de pacients amb T1D coincidiria amb l'increment en l'expressió descrita a pàncrees de pacients en un estudi amb microarrays [143]. Estaria d'acord també amb l'estudi on es demostrava que l'expressió del receptor IL-13 α 1, era més freqüent a cèl·lules T en els ganglis limfàtics pancreàtics de ratolins NOD prediabètics joves que no en ratolins diabètics adults [181]. A més a més, encara que no es pot excloure del tot, no sembla possible que la menor expressió del IL13R α 2 descrita, sigui deguda a polimorfismes en aquest gen i que això augmenti la susceptibilitat a patir diabetis tot i que si s'ha demostrat el seu paper en la susceptibilitat a l'esclerosi sistèmica.

La senyalització via el receptor de tipus 1 de la IL-13 (IL13R α 1) fosforila STAT6 i això indueix la transcripció del receptor de tipus 2 (IL13R α 2) [185,186]. Les dades aquí presentades, donen suport al paper de la senyalització via IL-13 en alteracions de les cèl·lules Tef a la T1D [181,183]. De fet, les cèl·lules Tef de pacients amb T1D expressen alts nivells de IL13R α 1 i baixos nivells de IL13R α 2 comparats amb els controls i aquest fet podria modular la senyalització de la IL-13 *in vivo* [187, 126]. Encara que IL13R α 2 ha estat considerat com a un receptor "decoy", la senyalització via IL13R α 2 ha estat implicada en l'activació del promotor del factor de creixement TGF β 1, fet que li ha donat una certa importància com a receptor de senyalització [126]. A més a més, el receptor IL13R α 2 pot actuar com a un regulador negatiu dels efectes de la IL-13. El receptor IL13R α 2 expressat després de l'exposició a IL-13, surt ràpidament a la membrana cel·lular des d'ubicacions intracel·lulars per capturar i internalitzar la IL-13 extracel·lular [187]. El receptor IL13R α 2, és un receptor d'alta afinitat, per tant, pot reduir la quantitat d'IL-13 disponible que es podria unir a IL13R α 1, en un bucle de retroalimentació negativa. Així, un patró de control amb alta expressió de IL-13R α 2 promouria la regulació, mentre que el fet de que predomini la senyalització via

IL-13R α 1, com sembla que passa en pacients amb T1D, evita en certa manera, l'acció reguladora de la IL-13R α 2. Tot i així, diferents estudis realitzats en ratolins knock-out per el IL-13R α 1 no van mostrar una disminució de la secreció de citocines de tipus Th2. Això era possiblement degut al fet de que la unió de les subunitats entre el receptor IL13R α 1 i IL-4R α uneixen tant IL-4 com IL-13, per tant, l'absència de IL-13R α 1 fa que la IL-4 s'uneixi més fortament al receptor específic per IL-4, el qual no necessita de la unió a IL-13R α 1 [188]. Curiosament, d'altres estudis on s'estudia l'efecte de IL13R α 2 usant ratolins KO per IL13R α 2 van mostrar que nivells de citocines immunoreguladores com IL-10, IL-4 i TGF- β eren similars als observats a ratolins wild type [189]. D'altres estudis encara més recents, van suggerir que la cua citoplasmàtica del receptor IL13R α 2 jugava un paper important modulant la senyalització via IL-4 a través de la interacció amb la cua citoplasmàtica del IL4R α . Diferents experiments van mostrar que la sobreexpressió de L13R α 2 atenuava la fosforilació d'STAT6 . L'absència de dominis citoplasmàtics de IL13R α 2 va atenuar la senyalització via IL-13 però no va afectar a la senyalització via IL-4 així com tampoc a la fosforilació d'STAT6, suggerint que la interacció física entre les cues citoplasmàtiques de IL13R α 2 i IL4R α regula la senyalització de IL-4 a través del complex del receptor format per IL13R α 1-ILR4 α [127].

Els mecanismes proposats per a la regulació per les cèl·lules iNKT sobre les cèl·lules Tef en models de ratolins NOD, va implicar l'acció de diferents tipus cel·lulars, però no un efecte directe de la IL-13 derivada de les cèl·lules iNKT sobre les cèl·lules Tef [190, 191]. Aquestes diferències, podrien ser explicades pels diferents estadis de diferenciació de cèl·lules Tef i cèl·lules iNKT entre ratolins NOD i humans. Tot i així, els ratolins NOD mostren una alta producció basal d'IL-13, de manera que el mecanisme proposats per a la regulació produïda per cèl·lules iNKT humanes podria no ser detectada en aquest model [192].

Tot i que l'ús d' α GalCer per al tractament o prevenció de la T1D humana encara no ha estat provat de manera concloent, l'efecte de la IL-13 en la regulació per cèl·lules iNKT fa interessant la recerca d'anàlegs d' α GalCer que potenciïn la secreció d'IL-13 a cèl·lules de pacients amb T1D amb finalitats terapèutiques. Les cèl·lules iNKT produeixen de forma explosiva una sèrie de citocines pro i antiinflamatòries quan són estimulades amb α GalCer o anti-CD3, però l'estimulació amb lligands alternatius anàlegs de l' α GalCer que interaccionen amb alta afinitat amb el TCR de les cèl·lules iNKT pot conduir a la secreció selectiva de citocines de tipus Th1 mentre que una interacció de baix afinitat indueix la secreció de citocines de tipus Th2 [1, 93, 132].

En aquest context i amb la finalitat de trobar anàlegs de l' α GalCer que potenciessin la secreció d'IL-13 per les cèl·lules iNKT, es va analitzar la resposta de diverses iNKT a l'activació per diferents anàlegs lipídics d'estructura similar a l' α GalCer, reconeguts i presentats per molècules de CD1d. Estudis previs havien demostrat que aquests 8 anàlegs estudiats activaven cèl·lules iNKT de ratolins però amb diferent potència (*Rossjhon et al. dades no publicades*) basant-se en el grau d'activació que produïen, classificant-los com a dèbils, de potència intermitja i potència forta.

Els resultats van mostrar que els diferents anàlegs de l' α GalCer no només van tenir la capacitat d'activar les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D sinó que va haver-hi 4 dels 8 anàlegs analitzats on es va veure un augment de la secreció d'IL-13 en comparació amb la produïda en resposta a l'activació per l' α GalCer. Aquestes dades són molt interessants ja que suggereixen l'ús de diferents anàlegs com a teràpia per poder augmentar la secreció d'IL-13 per les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D i per tant, la seva capacitat supressora. Estudis futurs haurien de permetre definir la via de senyalització de la IL-13 com a diana terapèutica d'immunointervenció en estadis primerencs als pacients amb T1D.

Per tant, per primera vegada; (a) es demostra la capacitat supressora de les cèl·lules iNKT humanes, proporcionant informació sobre l'efecte de regulació directa de les cèl·lules iNKT activades amb α GalCer sobre les cèl·lules Tef CD4⁺; (b) es demostra que la via de la IL-13, és un component essencial en el mecanisme de regulació per les cèl·lules iNKT; (c) es demostra que el defecte en el nivell de regulació per les cèl·lules iNKT a pacients amb T1D al debut de la malaltia, està relacionat amb deficiències en la via d'IL-13 i (d) cèl·lules iNKT d'individus sans i de pacients amb T1D responen a la estimulació d'anàlegs de l' α GalCer, aportant nous mètodes d'immunoteràpia basada en l'activació de cèl·lules iNKT amb anàlegs de l' α GalCer.

Resultats Capítol 2:

Les cèl·lules iNKT com adjuvants de la funció supressora de les cèl·lules Treg

Background

Estudis realitzats a humans, han relacionat la baixa freqüència de cèl·lules Treg i la seva reduïda capacitat supressora, amb el desenvolupament de la T1D [1]. S'han descrit diversos experiments intentant buscant immunoteràpies usant cèl·lules Treg, però tot i així, s'han trobat amb una sèrie de problemes, ja que les cèl·lules Treg són cèl·lules restringides per molècules de MHC II, les quals són molt polimòrfiques i això comporta greus problemes d'histocompatibilitat entre diferents individus. En aquest context, tal i com s'ha mostrat al [capítol 1](#), les cèl·lules iNKT són cèl·lules restringides per molècules de CD1, tenen capacitat supressora i secreten grans quantitats de citocines immunoreguladores. Les molècules de CD1 són molècules presentadores d'antígens no polimòrfiques, la qual cosa podria evitar els problemes d'histocompatibilitat entre individus. A més a més, les cèl·lules iNKT tenen capacitat per interaccionar i modular la funció d'altres tipus cel·lulars del sistema immunitària. Així, diversos estudis han suggerit que les cèl·lules iNKT i les cèl·lules Treg es modulen mútuament, així com també a d'altres poblacions cel·lulars. Per tant, (a) les cèl·lules iNKT amb la seva capacitat ràpida de secreció de citocines poden modificar la funció de les cèl·lules Treg produint alts nivells d'IL-2 i (b) l'IL-10 secretada per les cèl·lules iNKT podria interferir en la diferenciació de les cèl·lules Treg específiques d'antigen. Amb això, experiments realitzats *ex vivo* van demostrar que les cèl·lules iNKT estimulades amb α GalCer podien induir l'expansió de cèl·lules Treg CD4⁺CD25⁺ depenent d'IL-2 [2]. Les cèl·lules iNKT poden reclutar APCs tolerogèniques que promouen la generació de cèl·lules Treg i inhibeixen la resposta Th1. Tot i així, no se sap on, quan i com, les cèl·lules iNKT interaccionen amb les cèl·lules Treg; sí és una interacció directa o a través de cèl·lules presentadores d'antigen i com és el resultat funcional d'aquesta interacció.

Per tant, en aquest [capítol 2](#) ens proposem estudiar un possible mètode d'immunoteràpia en base a la interacció entre cèl·lules iNKT i cèl·lules Tregs, estudiant el mecanisme, així com les conseqüències funcionals de la interacció entre les cèl·lules iNKT i les cèl·lules Treg, per augmentar la capacitat supressora de les cèl·lules Treg durant la resposta autoimmunitària.

C2. 1. Les cèl·lules Treg expandides *in vitro* suprimeixen la proliferació de les cèl·lules Tef a individus sans

Es van aïllar cèl·lules Treg i Tef autòlogues a partir de PBMCs de controls sans usant el sistema Automacs, en base a l'expressió del marcador de superfície CD25. Després de la separació, es van obtenir dos poblacions cel·lulars corresponent a cèl·lules Treg, amb un fenotip $CD3^+CD4^+CD25^{high}$ en un 88,1% i cèl·lules Tef amb fenotip $CD3^+CD4^+CD25^-$ en un 93,5% respecte del total de cèl·lules $CD3^+$. Degut a la baixa freqüència de cèl·lules Treg a sang perifèrica, aquestes es van haver de expandir *in vitro* usant el protocol descrit a l'apartat de materials i mètodes. Les poblacions de cèl·lules Treg i Tefs resultants de l'expansió, es van caracteritzar per citometria de flux usant anticossos monoclonals específics: anti-CD3, CD25, CD4 i Foxp3 tant per cèl·lules Treg com per cèl·lules Tef (Fig. 1).

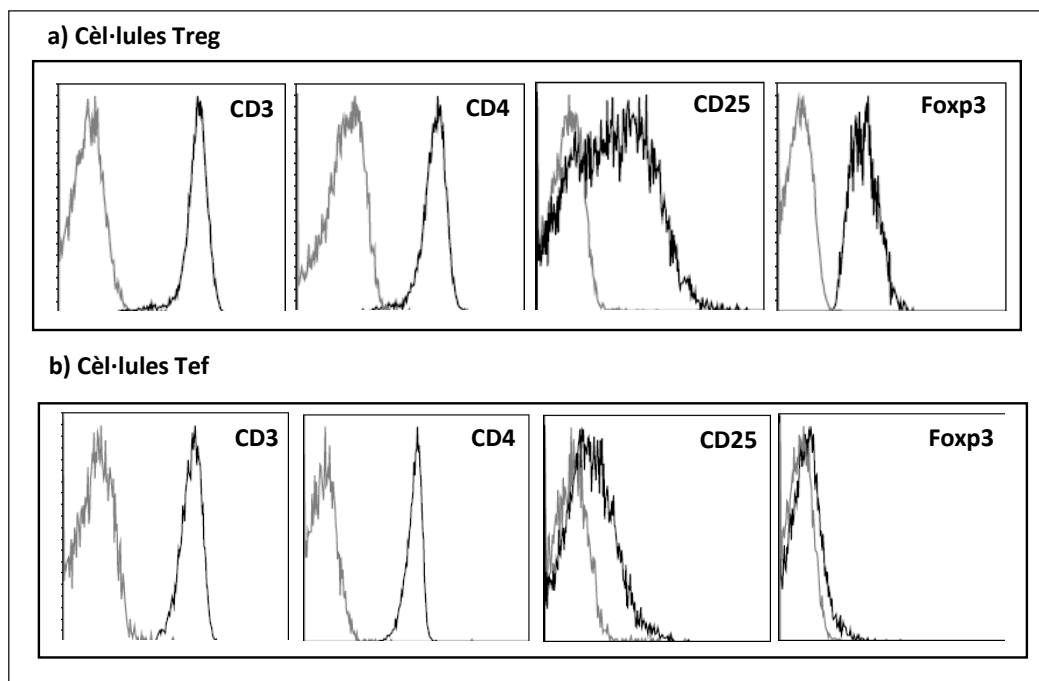


Figura 1. Caracterització fenotípica de les cèl·lules Treg ($CD3^+CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$) (a) i de les cèl·lules T efectores (Tef) ($CD3^+CD4^+CD25^-Foxp3^-$) (b) d'individus sans.

Es va determinar la capacitat supressora de les cèl·lules Treg a partir d'assajos de supressió *in vitro*, on les cèl·lules Treg ($CD3^+CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$) es van cultivar amb cèl·lules Tef autòlogues usant diferents ràtios de cèl·lules Treg:Tef. Beads conjugades a $\alpha CD3/CD28$ es van usar com a estímul i la proliferació cel·lular es va mesurar en funció de la incorporació de Thy- H^3 .

Els resultats van indicar, que la proliferació de les cèl·lules Tef disminuïa en afegir números creixents de cèl·lules Treg al cultiu de Tef (Fig. 2a). Usant ràtios alts de cèl·lules Treg:Tef (2:1), s'aconseguia aproximadament un 60% de supressió mostrant diferències estadísticament significatives entre ràtios (T-student; $p < 0,05$) (Fig. 2b). La proliferació de les cèl·lules Treg soles, va ser similar a la de les cèl·lules utilitzades com a feeders (PBMCs autòlegs irradiats).

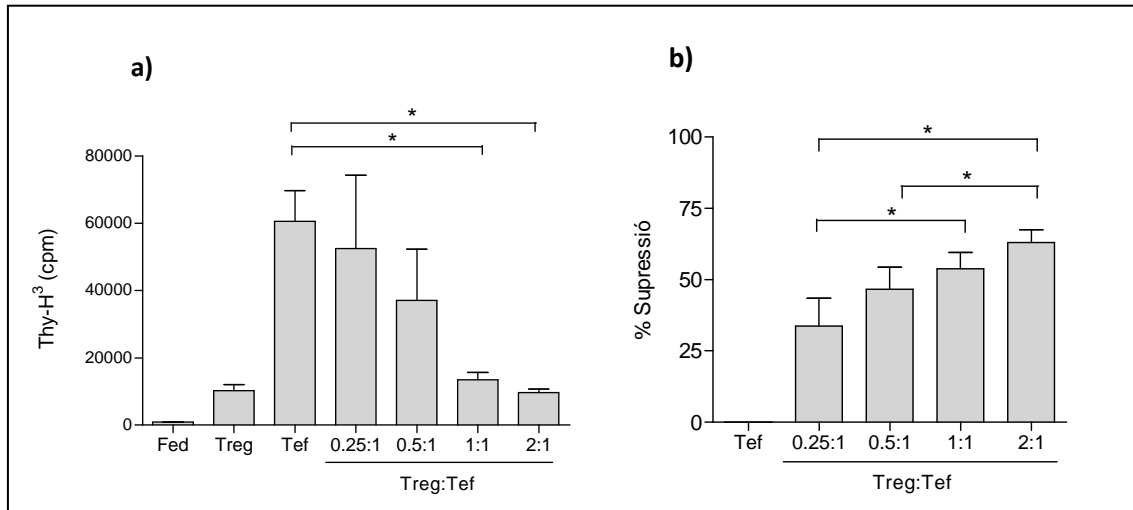


Figura 2. Les cèl·lules Treg expandides *in vitro* d'individus sans tenen capacitat supressora. (a) Proliferació cel·lular utilitzant diferents ràtios Treg:Tef. El gràfic mostra un exemple de tots els experiments realitzats (n=10). Les diferències són estadísticament significatives entre Tef vs 1:1 Treg:Tef ($p=0,050$) i Tef vs 2:1 Treg:Tef ($p=0,050$). **(b) Percentatge de supressió utilitzant ràtios creixents de cèl·lules Treg:Tef.** El gràfic mostra la mitjana del percentatge de supressió de tots els experiments realitzats (n=10). Les diferències són estadísticament significatives entre els ràtios Treg:Tef de 0,25:1 vs 1:1 ($p=0,0338$), 0,25:1 vs 2:1 ($p=0,0103$) i 0,5:1 vs 2:1 ($p=0,0385$).

Aquest resultats van mostrar que les cèl·lules Treg d'individus sans expandides *in vitro* tenien capacitat supressora.

C2. 2. Les cèl·lules Treg d'individus sans tenen més capacitat supressora que les cèl·lules Treg de pacients amb T1D

Diferents estudis havien relacionat el desenvolupament de les malalties autoimmunitàries amb una disminució de la freqüència i/o una funció reguladora deficient per les cèl·lules Treg en aquests pacients. Es volia comprovar doncs, si la capacitat supressora de les cèl·lules Treg de pacients amb T1D al debut de la malaltia estava alterada.

Es van aïllar cèl·lules Treg i Tef autòlogues a partir de PBMCs de pacients amb T1D usant el sistema Automacs. Després de la separació, es van obtenir dos poblacions cel·lulars corresponent a les cèl·lules Treg, amb un fenotip $CD3^+CD4^+CD25^{high}$ en un 86,5% i les cèl·lules Tef amb fenotip $CD3^+CD4^+CD25^-$ en un 82,9% respecte del total de cèl·lules T $CD3^+$. Es va mesurar la proliferació de cèl·lules Tef estimulades amb beads conjugats amb $\alpha CD3/CD28$ en presència de cèl·lules Treg autòlogues usant diversos ràtios Treg:Tef.

Els resultats obtinguts indicaven, que les cèl·lules Treg de pacients amb T1D podien suprimir la proliferació de les cèl·lules Tef autòlogues, però tenien una menor capacitat supressora que les cèl·lules Treg d'individus sans (Fig. 3). Si observem la Fig. 3, al ràtio 1:1 de Treg:Tef, en el qual les cèl·lules Treg derivades d'individus sans assoleixen aproximadament un 56% de supressió de la proliferació de les cèl·lules Tef, les cèl·lules Treg derivades de pacients amb T1D arriben a un màxim del 36% de supressió de la proliferació de les cèl·lules Tef (Fig.3).

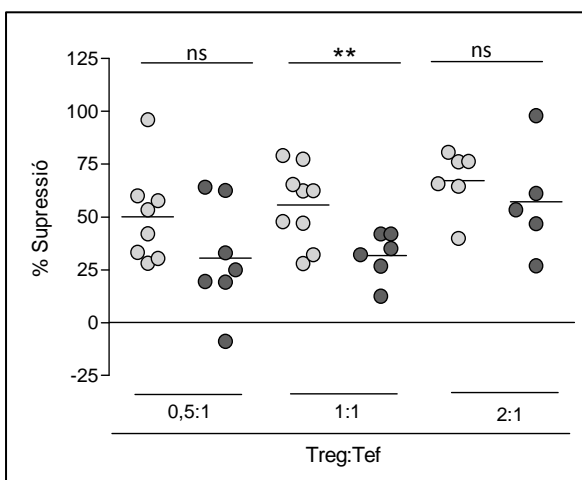


Figura 3. Les cèl·lules Treg de pacients amb T1D són deficientes, suprimint la proliferació de les cèl·lules Tef autòlogues. Comparació del percentatge de supressió de cèl·lules Treg d'individus sans i cèl·lules Treg de pacients amb T1D al debut de la malaltia, usant diferents ràtios Treg:Tef. Les diferències van ser estadísticament significatives usant un ràtio 1:1 de Treg:Tef (T-student ràtio 1:1; $p=0,0088$; ràtio 0,5:1 $p=0,0946$ i ràtio 2:1 $p=0,1645$).

Segons aquestes dades, podem dir doncs que les cèl·lules Treg de pacients amb T1D tenen una menor capacitat supressora, ja que cal un ràtio més alt de Treg:Tef per aconseguir el mateix grau de supressió que usant cèl·lules Treg d'individus sans.

Estudis publicats prèviament havien descrit que les cèl·lules Tef de pacients amb autoimmunitat podien ser refractàries a la regulació. Per això es va voler analitzar, si la baixa capacitat supressora de les cèl·lules Treg de pacients amb T1D, era deguda a una alteració funcional de les cèl·lules Treg o bé que les cèl·lules Tef d'aquests pacients no es deixaven regular. Així, es va mesurar la supressió de la proliferació en assajos *in vitro* usant diferents combinacions de cèl·lules Treg i Tef d'individus sans i de pacients amb T1D.

Les dades van mostrar, que les cèl·lules Treg de pacients amb T1D (Treg_{T1D}) inhibien la proliferació de cèl·lules Tef d'individus sans (Tef_{HD}) assolint un percentatge de supressió màxim del 37% a un ràtio 2:1 de Treg_{T1D}:Tef_{HD} (Fig. 4a). Les diferències van ser estadísticament significatives a un ràtio 0,5:1 vs 2:1 ($p=0,0042$) i 1:1 vs 2:1 ($p=0,0131$) de Treg_{T1D} vs Treg_{HD}. Aquest nivell de supressió, tot i que lleugerament més baix, era similar al que s'obtenia amb cèl·lules Treg i Tef d'individus sans (Fig. 2). En canvi, les cèl·lules Treg d'individus sans (Treg_{HD}) requerien ràtios més alts de cèl·lules Treg:Tef per aconseguir el mateix grau de supressió de les cèl·lules Tef de pacients amb T1D (Fig. 4b). Les diferències van ser estadísticament significatives entre els ràtios 0,5:1 vs 1:1 ($p=0,0152$), 0,5:1 vs 2:1 ($p=0,0007$), 1:1 vs 2:1 ($p=0,0202$) de Treg_{HD} vs Treg_{T1D}.

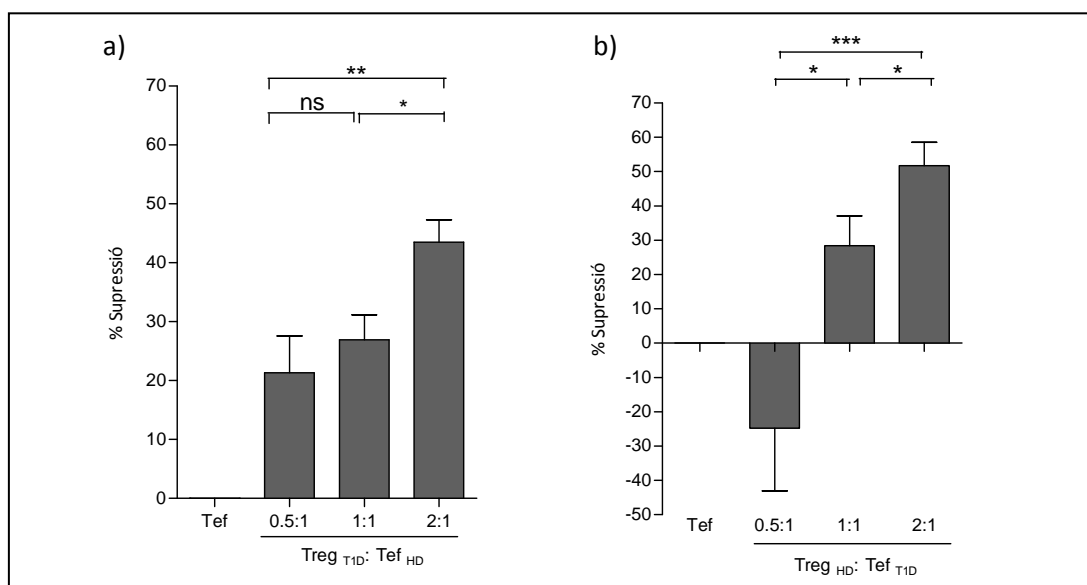


Figura 4. Les cèl·lules Treg de pacients amb T1D suprimeixen de manera similar la proliferació de cèl·lules Tef autòlogues i al·logèniques. (a) Percentatge de supressió utilitzant cèl·lules Treg_{T1D} i cèl·lules Tef_{HD}. (b) Percentatge de supressió usant Treg_{HD} i cèl·lules Tef_{T1D}. Les dades representen la mitjana de tots els experiments realitzats (a) $n=4$ i (b) $n=4$. (T-student on * $p<0,05$; ** $p<0,005$ i *** $p<0,001$).

Per tant, aquestes dades suggereixen, que la disminució dels nivells de supressió a pacients amb T1D, no és tant un defecte de les cèl·lules Treg, sinó que podria ser deguda a la resistència a la regulació de les cèl·lules Tef dels pacients.

C2. 3. Les cèl·lules iNKT d'individus sans com a adjuvant de la supressió produïda per les cèl·lules Treg

Els estudis del [capítol 1](#) havien demostrat la capacitat reguladora de les cèl·lules iNKT humanes i com aquesta depenia de la secreció d'IL-13. D'altra banda està ben documentat a la literatura la seva capacitat de secreció ràpida de citocines en ser activades i la seva habilitat per modificar el comportament d'altres tipus cel·lulars dels sistema immune durant la resposta immunitària.

Es volia estudiar per tant, si les cèl·lules iNKT podien modular la funció de les cèl·lules Treg, potenciant la seva funció supressora. Per això, es va analitzar si les cèl·lules iNKT d'individus sans tenien un efecte adjuvant a la supressió per cèl·lules Treg. Cèl·lules iNKT derivades de PBMCs d'individus sans i seleccionades en funció del seu TCR invariant TCRV α 24J α 18, es van expandir *in vitro* usant com a estímul α GalCer. Es va analitzar el fenotip de les cèl·lules expandides així com la seva restricció per CD1d ([capítol 1; apartat C.1.2](#)).

Es va analitzar la seva col·laboració en l'increment de la funció supressora de les cèl·lules Treg en assajos de supressió *in vitro* on s'usaven diferents combinacions de cèl·lules iNKT, Tregs i Tefs. Els resultats van mostrar que l'addició de cèl·lules iNKT als cocultius de Treg:Tef ajudava a disminuir encara més, els nivells de proliferació de cèl·lules Tef ([Fig. 6a i 6b](#)). Com es pot observar a les [Fig. 6a i 6b](#), a mesura que incrementava el número de cèl·lules iNKT als cocultius de Treg:Tef, on el número Treg:Tef es mantenia constant, augmentava el percentatge de supressió de la proliferació. Per tant, aquests resultats, van mostrar, que les cèl·lules iNKT expandides *in vitro* tenien un efecte adjuvant de la supressió per cèl·lules Treg.

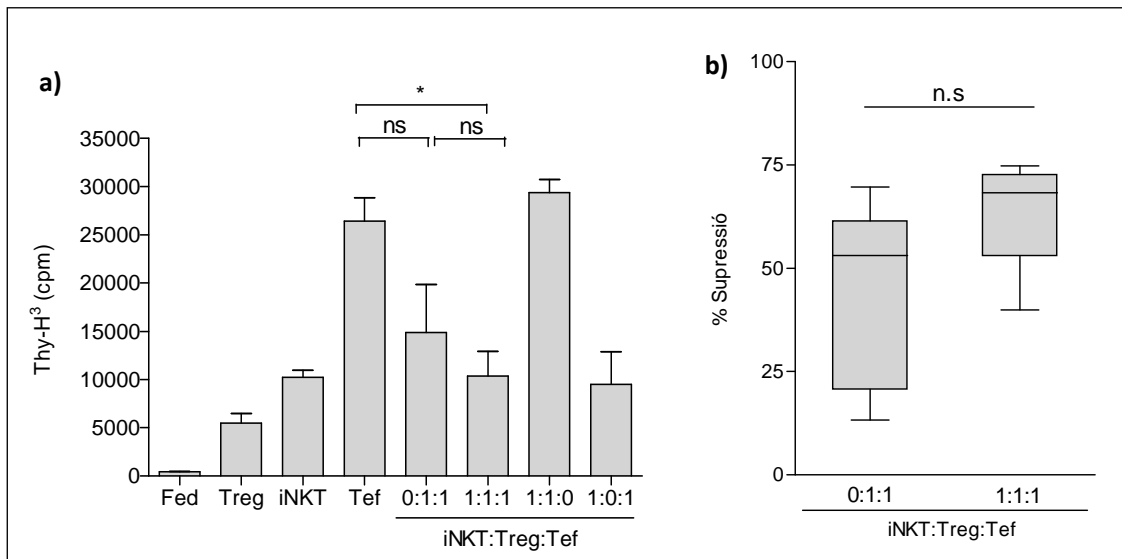


Figura 6. Les cèl·lules iNKT d'individus sans col·laboren amb les cèl·lules Treg incrementant la supressió de la proliferació. (a) Proliferació de cèl·lules Tef mesurada per la incorporació de Thy-H³ usant diferents ràtios de cèl·lules iNKT:Treg:Tef. El gràfic mostra un exemple de sis experiments realitzats. Les diferències són estadísticament significatives entre Tef vs 1:1:1 de iNKT:Treg:Tef ($p < 0,05$). (b) Mitjana del percentatge de supressió de tots els experiments realitzats ($n=6$) usant un ràtio 1:1:1 de iNKT:Treg:Tef. Les diferències no són estadísticament significatives ($p=0,0952$).

C2. 3. Les cèl·lules iNKT i Treg tenen mecanismes supressors diferents

S'havia proposat que un mecanisme a través del qual les cèl·lules Treg podien suprimir les cèl·lules Tef era inhibint la secreció d'IL-2. Per això es va mesurar la concentració d'IL-2 en els sobrenedants dels cocultius de cèl·lules Treg:Tef. Tal i com s'observa a la [Fig.7a](#) els nivells d'IL-2 detectats eren més baixos en els cocultiu de cèl·lules Treg:Tef que als cultius de les cèl·lules Tef soles. La correlació entre la disminució de la proliferació de les cèl·lules Tef en presència de cèl·lules Tregs i la reducció en la secreció d'IL-2 en els cocultius, confirmava que la inhibició de la secreció d'IL-2 és un dels mecanismes bàsics de supressió via cèl·lules Treg. Per avaluar si la disminució de l'IL-2 era resultat del contacte cèl·lula-cèl·lula entre Treg i Tef, es va mesurar la proliferació de les cèl·lules Tef usant el sistema de cultiu transwell, on les cèl·lules Treg i les cèl·lules Tef es cultivaven en diferents cambres del pouet i separades per una membrana semipermeable de 0,4 μm . Amb aquest sistema de cultiu, es va demostrar que la inhibició de la secreció d'IL-2 per cèl·lules Treg depenia del contacte cel·lular, ja que quan ambdues poblacions cel·lulars es sembraven per separat en els sistema de cultiu transwell, els nivells d'IL-2 secretats augmentaven ([Fig. 7a](#)).

Tal i com ja es va esmentar al [capítol 1](#), un dels mecanismes pels qual les cèl·lules iNKT produïen el seu efecte supressor era disminuint els nivells d'IL-2 secretats per les cèl·lules Tef. Per tant, en aquest cas, es va analitzar si l'efecte adjuvant per les cèl·lules iNKT també estava relacionat amb la disminució de la secreció d'IL-2. Així doncs, es va mesurar la concentració d'IL-2 en els sobrenedants dels cultius de cèl·lules iNKT, Treg i Tef.

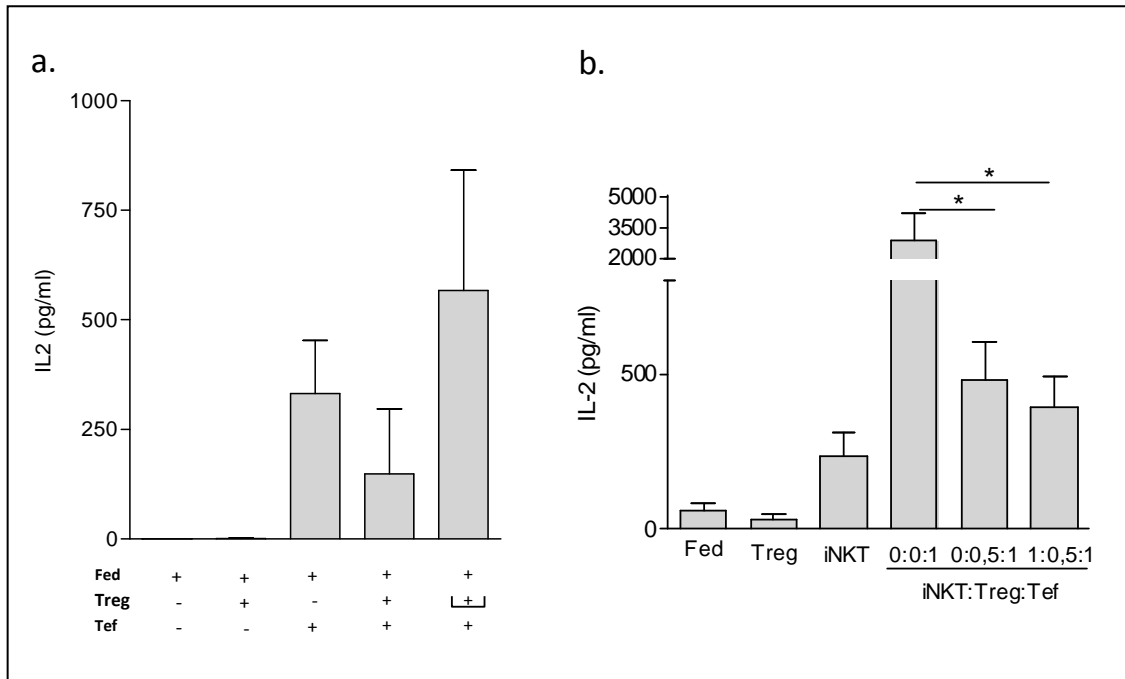


Figura 7. Les cèl·lules iNKT no contribueixen a la disminució dels nivells d'IL-2. (a) Quantificació dels nivells d'IL-2 en els cocultius de Treg:Tef quan les cèl·lules Treg i les Tef en contacte o estan separades en els sistemes de cultiu transwell. Les diferències no van ser estadísticament significatives. **(b)** Mesura de la concentració d'IL-2 quan les cèl·lules iNKT són afegides als cocultius de Treg:Tef. Les diferències són estadísticament significatives entre Tef vs Treg:Tef ($p=0,0325$) i Tef vs iNKT:Treg:Tef ($p=0,0141$).

Així doncs, es va comprovar que les cèl·lules Treg suprimien la proliferació de les cèl·lules Tef reduint la secreció d'IL-2 d'una manera dependent de contacte i que la presència de cèl·lules iNKT als cocultius de Treg:Tef feia disminuir molt lleument la concentració d'IL-2 al sobrenedant del cultiu. Per tant, podem dir que l'efecte adjuvant de les cèl·lules iNKT no estava relacionat amb una disminució de la secreció d'IL-2 (Fig. 7b).

C2. 4. Citocines reguladores secretades per cèl·lules iNKT col·laboren en l'efecte adjuvant produït per les cèl·lules iNKT a individus sans

Tal i com s'ha mostrat a [C.2.3](#) l'efecte adjuvant per les cèl·lules iNKT no és via IL-2. Per tant, per poder definir els mecanismes a través dels quals les cèl·lules iNKT d'individus sans exerceixen el seu efecte adjuvant, es va mesurar la secreció de diferents factors solubles, així com citocines immunomoduladores com l'IL-4, l'IL-10 i l'IL-13 per CBA als sobrenedats dels cultius de cèl·lules iNKT, Treg i Tef soles, així com als sobrenedants de les diferents combinacions entre elles.

Tal i com s'observa a la [Fig. 8a](#), les cèl·lules iNKT són les principals productores de citocines reguladores, ja que secreten tant IL-4, IL-10 com IL-13. Tot i així, les cèl·lules Treg també secreten IL-10 i sobretot alts nivells d'IL-13, però baixes quantitats d'IL-4 comparat amb les cèl·lules iNKT. Les cèl·lules Tef secreten IL-10 i IL-13 però a uns nivells més baixos que les cèl·lules Treg i/o cèl·lules iNKT i en secreten baixos nivells d'IL-4. Tal i com ja es va veure al [capítol 1](#) les cèl·lules iNKT són una font important de secreció d'IL-13, tot i que, els resultats mostren que les cèl·lules Treg també en produeixen en grans quantitats ([Fig. 8a](#)). Les mateixes citocines, es van analitzar en els cocultius de cèl·lules Treg i Tef ([Fig. 8b](#)), en aquest cas, sembla que les cèl·lules Treg van aportar citocines reguladores com l'IL-13, ja que els nivells de secreció respecte a l'IL-13 produïda en els sobrenedants de les cèl·lules Tef soles van ser més elevats, en canvi, els nivells d'IL-10 i IL-4 no van variar. Quan les cèl·lules iNKT es van afegir als cocultius de Treg:Tef ([Fig. 8c](#)) els nivells d'IL-13 van augmentar considerablement respecte als observats als cocultius, així com els nivells d'IL-4 i IL-10, tot i que els nivells d'aquestes últimes citocines va ser més dèbils.

Així, aquests resultats, van suggerir que l'efecte adjuvant produït per les cèl·lules iNKT és degut a l'aportació de citocines reguladores als cocultius de Treg:Tef, especialment de l'aportació d'IL-13, per part de les cèl·lules iNKT. Aquestes dades, van corroborar les dades obtingudes al [capítol 1](#) on es va parlar de la funció reguladora de l'IL-13 secretada per les cèl·lules iNKT, ja que en aquests cultius, on els tres tipus cel·lulars estaven junts (iNKT,Treg,Tef), no només va augmentar el nivell de supressió de les cèl·lules Tef, sinó que també van augmentar els nivells d'IL-13 respecte als trobats als cocultius en absència de cèl·lules iNKT.

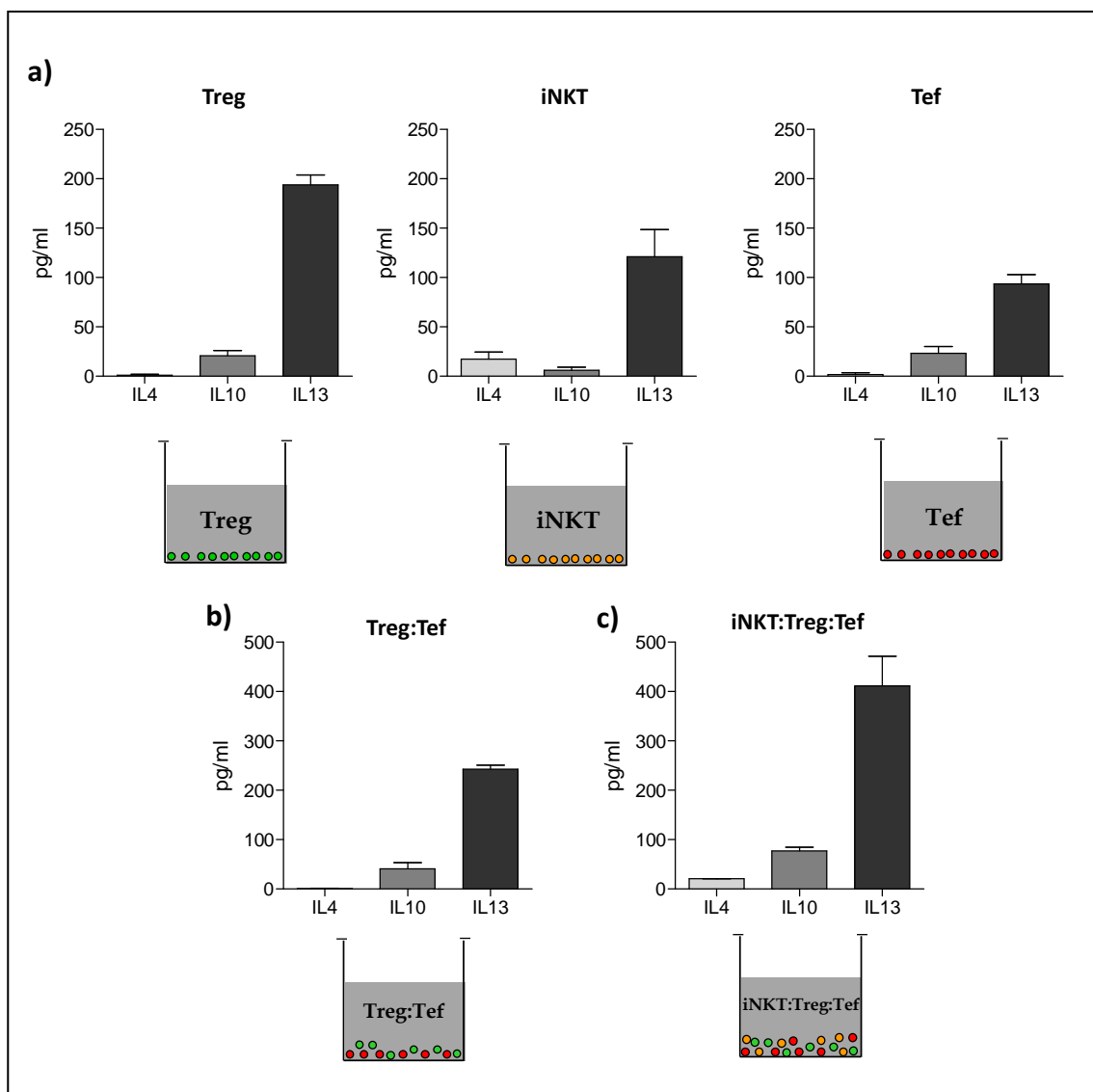


Figura 8. Citocines reguladores són responsables de l'efecte adjuvant produït per les cèl·lules iNKT. Secreció d'IL-4, IL-10 i IL-13 mesurada per CBA. (a) Secreció de citocines reguladores per cèl·lules Treg, iNKT i Tef cultivades soles. (b) Secreció de citocines reguladores en el cocultius de cèl·lules Treg:Tef. (c) Secreció de citocines en els cultius de iNKT:Treg:Tef.

C2. 5. L'efecte adjuvant produït per les cèl·lules iNKT és independent del contacte cel·lular

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, les cèl·lules iNKT tenen capacitat d'interaccionar i modificar el comportament i la funció d'altres tipus cel·lular del sistema immunitari, per tant, es va voler analitzar si l'efecte adjuvant per les cèl·lules iNKT sobre l'efecte supressor de les cèl·lules Treg era depenent de contacte cel·lular o bé, era degut només a la secreció de factors solubles.

Per poder analitzar la necessitat del contacte cel·lular, es van realitzar diferents assajos de supressió *in vitro* en sistemes de cultiu transwell, on les cèl·lules Treg i les cèl·lules Tef es van sembrar directament a la cambra de baix del sistema de cultiu transwell. Pel que fa a les cèl·lules iNKT, aquestes es van sembrar de tal manera, que si es cultivaven a la cambra de baix del sistema transwell, aquestes estaven en contacte amb les cèl·lules Treg i les cèl·lules Tef, en canvi, quan les cèl·lules iNKT eren cultivades a la cambra de dalt es mantenien separades i l'únic contacte entre elles, iNKT i cocultius, eren els factors solubles secretats, els quals podien creuar la membrana semipermeable de 0,4 μm del sistema transwell (Fig. 9a).

Les dades obtingudes van mostrar, que quan les cèl·lules iNKT estaven separades dels cocultius Treg:Tef, la secreció de citocines reguladores era lleugerament més baixa que quan les tres poblacions estaven en contacte (Fig. 9b).

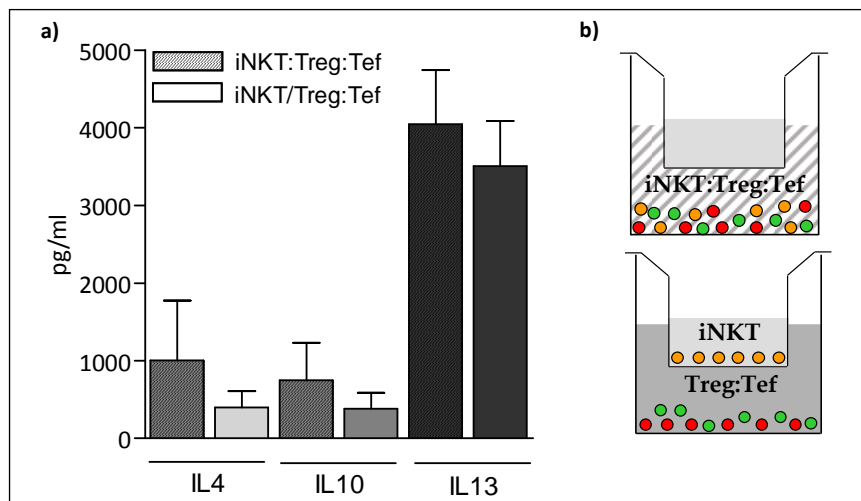


Figura 9. L'efecte adjuvant per les cèl·lules iNKT no depèn del contacte cel·lular. (a) Combinació de cèl·lules iNKT, Treg i Tef sembrades en el sistema de cultiu transwell. (b) Secreció d'IL-4, IL-10 i IL-13 mesurada en els cocultius de Treg:Tef quan les cèl·lules iNKT són afegides a la cambra de dalt o de baix del sistema transwell. El signe (/) indica que les cèl·lules iNKT estan separades de les cèl·lules Treg i de les Tefs. El gràfic mostra la mitjana de tots els experiments de cultius en sistema transwells realitzats (n=4). Les dades no van ser estadísticament significatives.

Per tant, aquestes dades suggerien, que l'efecte adjuvant per les cèl·lules iNKT era independent del contacte cel·lular. Com a dada important, es va observar que les cèl·lules iNKT aportaven grans quantitats d'IL-13, així com petites quantitats d'IL-4 i IL-10, independentment de si mantenien o no contacte amb els cocultius de Treg:Tef (Fig. 9b).

Per acabar de confirmar que l'efecte adjuvant produït per les cèl·lules iNKT d'individus sans era independent de contacte cel·lular, però depenent de factors solubles, es van fer diversos assajos de supressió *in vitro* usant diferents ràtios Treg:Tef, on es va transferir el sobrenedant de les 48h de cèl·lules iNKT cultivades *in vitro*. Així, un cop transferit als cocultius el sobrenedant de les 48h de les cèl·lules iNKT, al quart dia de cultiu es va analitzar la proliferació cel·lular per la incorporació de Thy-H³. Com mostra la Fig. 8 la citocina que més va augmentar en els tri-cultius (iNKT, Treg i Tef) va ser l'IL-13, per tant, es va analitzar la presència d'IL-13 per CBA en els sobrenedants de les 48h de les cèl·lules iNKT, afegits als cocultius de Treg:Tef (Fig. 10a). Els resultats van confirmar la presència d'IL-13 en el sobrenedant de les cèl·lules iNKT. L'assaig de supressió va mostrar, que l'addició del sobrenedant de cèl·lules iNKT (48h), va ser suficient per reduir la proliferació de les cèl·lules Tef en els cocultius (Fig. 10b). Les dades analitzades, van mostrar diferències estadísticament significatives entre la proliferació de Tef vs Treg:Tef sense afegir el sobrenedant; Tef vs Treg:Tef afegint el sobrenedant de les 48h i entre Treg:Tef sense afegir el sobrenedans vs afegint-lo (*p<0,050).

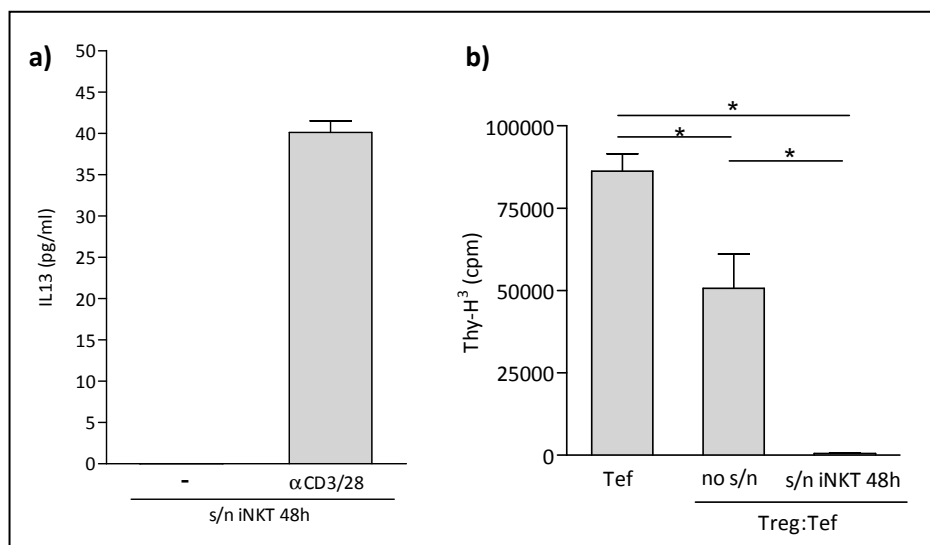


Figura 10. L'efecte adjuvant produït per les cèl·lules iNKT és dependent, en part, de la secreció d'IL-13. (a) Concentració d'IL-13 mesurada per CBA en el sobrenedant de les 48h del cultius de cèl·lules iNKT. (b) Proliferació cel·lular mesurada per la incorporació de Thy-H³ en els cocultius Treg:Tef quan es va afegir el sobrenedant de les 48h de les cèl·lules iNKT. Les dades son representatives de dos experiments realitzats i les diferències va ser estadísticament significatives (T-student *= p<0,05).

Així, els resultats obtinguts, van confirmar, que part de l'efecte adjuvant per les cèl·lules iNKT, era degut a la secreció d'IL-13, ja que l'anàlisi del sobrenedant afegit als cocultius va mostrar la seva presència.

C2. 6. Citocines pro-inflamatòries no estan implicades en l'efecte adjuvant produït per les cèl·lules iNKT

Ja que una de les característiques principals de les cèl·lules iNKT és la seva secreció de citocines, tant de tipus Th1 com de tipus Th2, es van voler analitzar diferents citocines pro-inflamatòries, com TNF α , IFN γ , IL-17A, amb la finalitat d'estudiar si aquestes podien tenir cap efecte en la funció adjuvant de les cèl·lules iNKT.

Els resultats van mostrar, que tots els tipus cel·lulars utilitzats a l'assaig, cèl·lules Treg, iNKTs i Tefs, feien de totes les citocines pro-inflamatòries analitzades, tot i que la quantitat secretada per cada una d'elles va ser diferent (Fig. 11a). Les cèl·lules Treg van ser les cèl·lules que menys quantitat, en general, de citocines de caràcter pro-inflamatori van secretar en comparació amb les cèl·lules iNKT i Tefs. La font principal de TNF α i IFN γ van ser les cèl·lules Tef i les cèl·lules iNKT, tot i que les cèl·lules Treg també en van fer però en menys quantitats. La secreció d'IL-17A, produïda principalment per cèl·lules Th17, va ser secretada en el nostre sistema, per les cèl·lules Treg, ja que nivells molts baixos, quasi indetectables, van ser secretats per cèl·lules iNKT i Tefs (Fig. 11a). Quan les mateixes citocines van ser analitzades als cocultius de Treg:Tef, la secreció de citocines va ser molt similar al patró de citocines secretades per les cèl·lules Tef cultivades soles (Fig. 11b). En canvi, quan les cèl·lules iNKT es van afegir als cocultius de Treg:Tef, els nivells de IFN γ van augmentar més que la resta de citocines analitzades, les quals també van augmentar però més lleugerament (Fig. 14c).

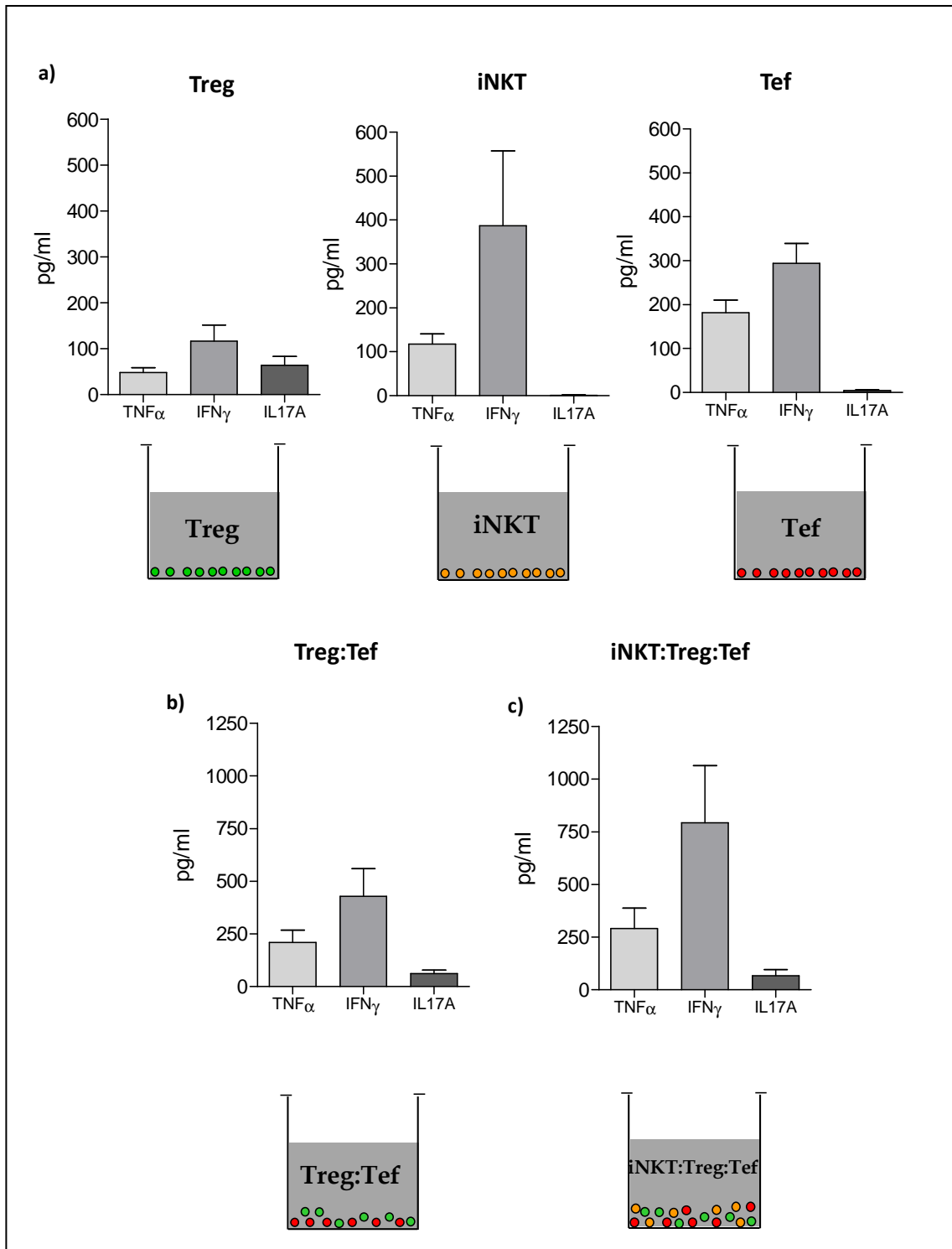


Figura 14. Citocines pro-inflamatòries no estan implicades en l'efecte adjuvant de les cèl·lules iNKT. La secreció de TNF α , IFN γ i IL-17A va ser mesurada per citometria de flux usant el sistema CBA. **(a)** Secreció de citocines per cèl·lules Treg, iNKT i Tef. **(b)** Secreció de citocines pro-inflamatòries en el cocultius de Treg:Tef. **(c)** Secreció de citocines en els tri-cultius de iNKT:Treg:Tef. Les dades representen la mitjana de tots els experiments realitzats (n=4).

C2. 7. Les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D no tenen un efecte adjuvant de la supressió produïda per cèl·lules Treg

Els resultats descrits al [capítol 1](#) demostraven la deficiència funcional de les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D. Tot i així, es va voler analitzar si tot i que les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D per elles mateixes no podien suprimir la proliferació de les cèl·lules Tef, podien tenir un efecte adjuvant de la supressió per cèl·lules Treg, tal i com s'havia vist amb les cèl·lules iNKT d'individus sans. Els assajos de supressió *in vitro* usant diferents combinacions de cèl·lules iNKT, Treg i Tef van demostrar que les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D no contribuïen a augmentar la supressió produïda per cèl·lules Treg, tal i com ja s'esperava ([Fig. 15](#)).

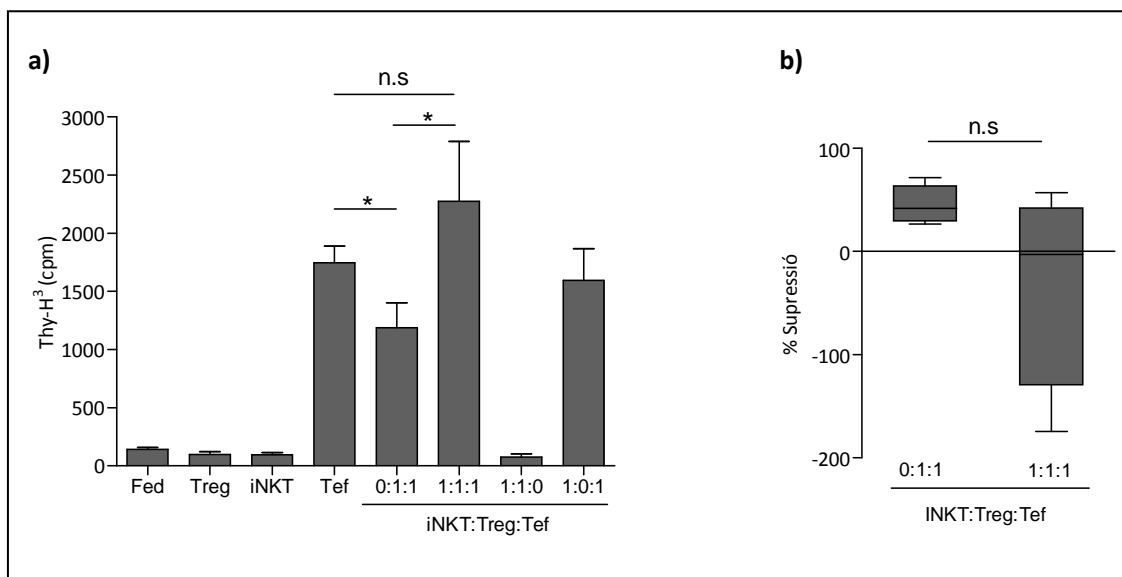


Figura 15. Les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D no tenen efecte adjuvant de la supressió produïda per les cèl·lules Treg. (a) Proliferació de cèl·lules Tef usant diferents combinacions de cèl·lules iNKT:Treg:Tef. El gràfic mostra un exemple de tots els experiments realitzats (n=5). Les diferències són estadísticament significatives entre Tef vs 0:1:1 i entre 0:1:1 vs 1:1:1 (*p<0,05). (b) Mitjana del percentatge de supressió de tots els experiments realitzats (n=5) usant un ràtio 1:1:1 de iNKT:Treg:Tef. Les diferències no són estadísticament significatives (p=0,0754).

Aquestes dades, van mostrar que les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D, no contribuïen a la funció supressora per les cèl·lules Treg.

Quan es va comparar la contribució a la supressió per cèl·lules Treg de les cèl·lules iNKT d'individus sans amb la de les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D, es va veure clarament, que les cèl·lules iNKT dels pacients, no tenien aquest efecte adjuvant ([Fig. 16](#)).

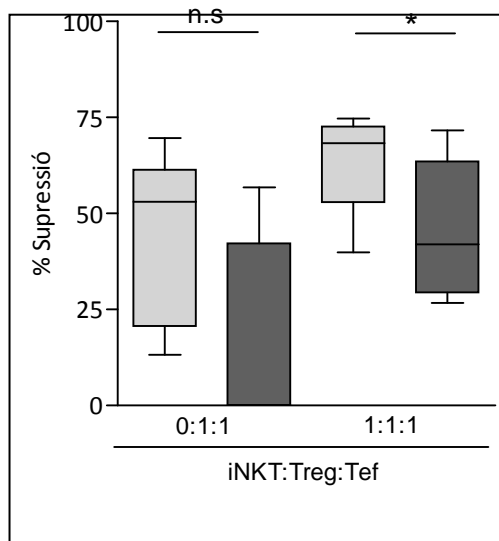


Figura 16. Comparació de l'efecte adjuvant per cèl·lules iNKT d'individus sans i cèl·lules iNKT de pacients amb T1D. El gràfic mostra el % de supressió per cèl·lules iNKT de controls (barres gris clar) i de pacients amb T1D (barres gris fosc) quan són afegides als cocultius Treg:Tef usant un ràtio 1:1:1 de iNKT:Treg:Tef. El gràfic mostra la mitjana de tots els experiments realitzats. Les dades són estadísticament significatives usant un ràtio de 1:1:1 iNKT:Treg:Tef (t-student, $p=0,0159$).

Per tant, aquestes dades ajuden a reafirmar els resultats obtinguts al [capítol 1](#), on es va observar que les cèl·lules iNKT dels pacients amb T1D tenien defectes en la seva habilitat per suprimir la proliferació de les cèl·lules Tef autòlogues.

C2 8. Les cèl·lules iNKT dels pacients amb T1D secreten baixos nivells de citocines immunoreguladores

Tal i com es va explicar al [capítol 1](#), la deficient capacitat supressora per les cèl·lules iNKT a pacients amb T1D correlacionava amb nivells baixos de secreció d'IL-13. A més a més, les cèl·lules iNKT dels pacients amb T1D no tenen efecte adjuvant de la supressió produïda per les cèl·lules Treg. Per tant, es va voler analitzar si un dels motius pel qual les cèl·lules iNKT del pacients amb T1D no contribuïen a l'efecte adjuvant produït per les cèl·lules Treg era per la seva incapacitat de secreció de factors solubles de caràcter immunoregulador. Per això, es va comparar la secreció de citocines reguladores, IL-4, IL-10 i IL-13, secretades en els tri-cultius (iNKT:Treg:Tef) de cèl·lules d'individus sans amb les de pacients amb T1D.

Tal i com s'observa a les [Fig. 17a i 17b](#), en general als tri-cultius, la secreció de citocines a pacients amb T1D és molt més baixa comparada amb la secreció de citocines reguladores produïdes als tri-cultius de cèl·lules d'individus sans. En aquest cas, sembla que les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D no aporten citocines immunoreguladores, ja que els nivells secretats són molt baixos. Les anàlisis estadístics van donar diferències estadísticament significatives entre les citocines produïdes als tri-cultius d'individus sans comparat amb les secretades a pacients amb T1D (IL-4_{HD} vs IL-4_{T1D} $p=0,0020$; IL-10_{HD} vs IL-10_{T1D} $p=0,0020$; IL-13_{HD} vs IL-13_{T1D} $p=0,0040$). En tots

els casos, la secreció de citocines reguladores va ser molt més alta a individus sans que a pacients amb T1D.

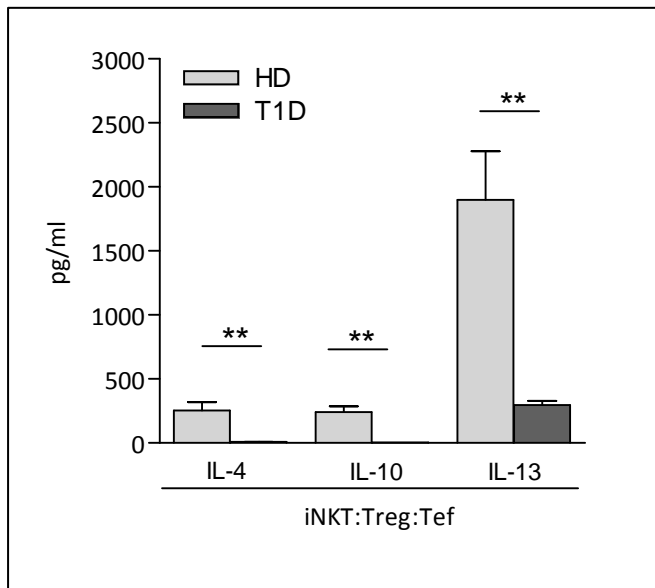


Figura 17. Les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D secreten baixos nivells de citocines immunoreguladores. A la gràfica s'observa les diferències en el nivell de citocines secretades en els cultius de iNKT:Treg:Tef entre individus sans i pacients amb T1D. Les diferències són estadísticament significatives en tots els casos (** $p < 0,005$).

C2. 9. Les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D secreten baixes quantitats de citocines pro-inflamatòries

Ja que tal i com es mostra a la Fig. 17 les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D secretaven baixos nivells de citocines immunoreguladores, per tant, es van analitzar diverses citocines pro-inflamatòries per estudiar si, en part, un dels defectes a nivell de regulació per les cèl·lules iNKT del pacients amb T1D, podria ser degut a un augment en la secreció de citocines pro-inflamatòries (Fig. 18).

El resultat va mostrar que en general, les cèl·lules de pacients amb T1D secretaven menys quantitat de citocines pro-inflamatòries que les cèl·lules d'individus sans. Les cèl·lules Treg de pacients amb T1D, van secretar nivells més baixos de $TNF\alpha$ i $IFN\gamma$ que les cèl·lules Treg d'individus sans. Curiosament, les cèl·lules Treg de pacients amb T1D no van secretar IL-17A, però sí les dels controls. Les cèl·lules Treg de pacients amb T1D, tal i com passava amb

les cèl·lules Treg d'individus sans, van secretar menys quantitat de citocines pro-inflamatòries que les cèl·lules iNKT i/o Tefs (Fig. 18a). Les anàlisis estadístics van mostrar diferències estadísticament significatives (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$). Quan es van analitzar les mateixes citocines als cocultius de Treg:Tef es va observar un augment a nivell de secreció de $TNF\alpha$ i d' $IFN\gamma$, tot i que els nivells van continuar sent més baixos a

pacients amb T1D que a controls i el patró de citocines als cocultius no va variar respecte a l'obtingut als cultius de cèl·lules Tef soles (Fig. 18b). Quan les cèl·lules iNKT es van afegir als cocultius de Treg:Tef (Fig. 18c), la secreció de citocines a pacients amb T1D no es va veure alterada respecte als cocultius. No es va detectar secreció d'IL-17A a pacients amb T1D. L'anàlisi d'aquestes dades van donar diferències estadísticament significatives entre la secreció d'IL-17A secretada per individus sans vs la secretada per pacients amb T1D (***) $p < 0,001$). En aquests mateixos cultius, els nivells d'IFN γ van augmentar a individus sans però la resta de citocines no es va veure alterada respecte dels cocultius. Així, les dades van mostrar diferències estadísticament significatives, entre les citocines secretades pels controls vs les secretades pels pacients amb T1D (T-student; * $p = 0,05$; ** $p = 0,005$; *** $p = 0,001$).

Aquests anàlisis suggereixen, que citocines pro-inflamatòries no van ser responsables del defecte en la capacitat supressora de les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D ni de la seva incapacitat com adjuvant de la funció supressora produïda per les cèl·lules Treg.

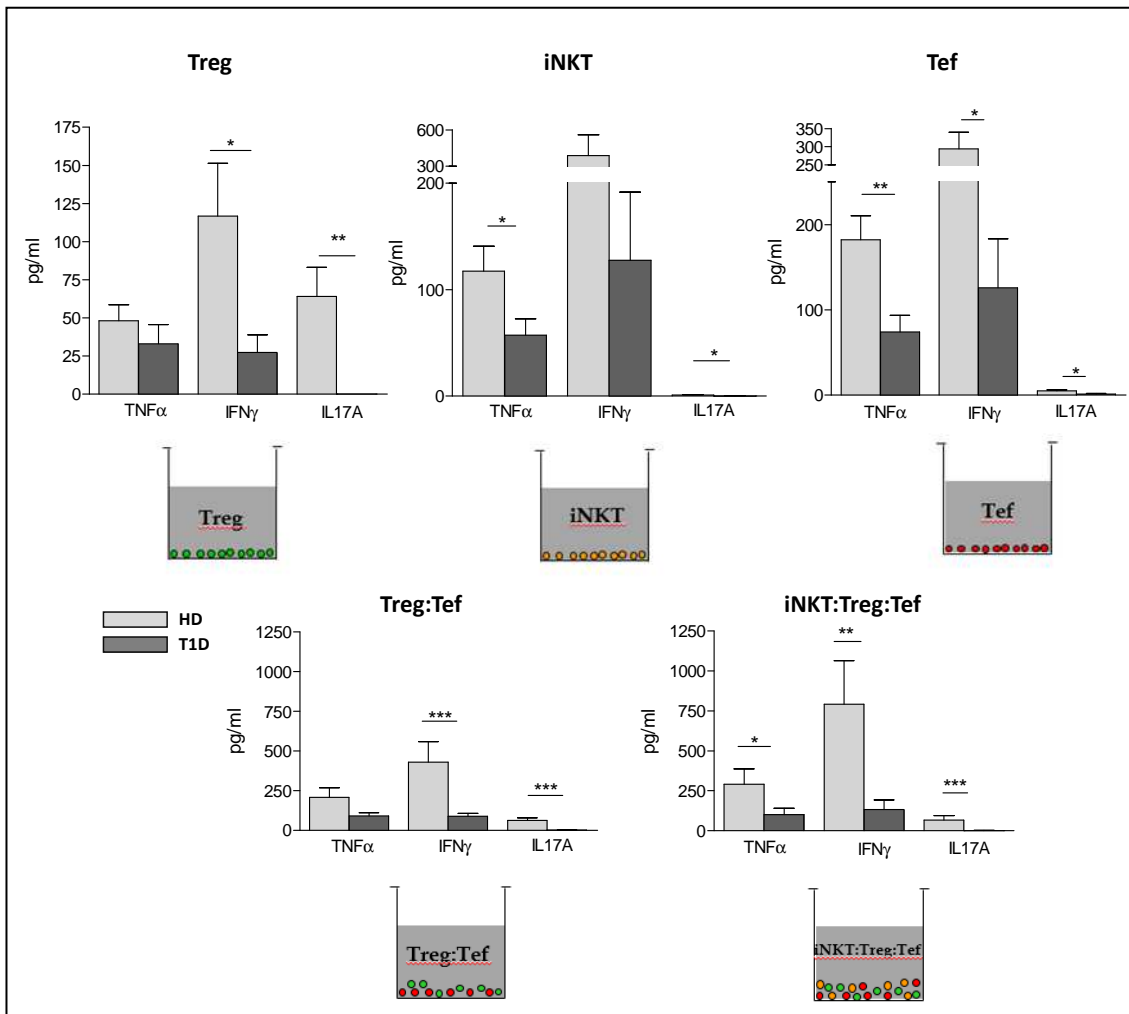


Figura 18. El defecte adjuvant per les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D no implica citocines pro-inflamatòries. Les citocines es van mesurar usant el sistema CBA i analitzant per citometria de flux. Les gràfiques mostren la secreció de citocines pro-inflamatòries per (a) cèl·lules Treg, iNKT i Tef; (b) cocultius Treg:Tef; (c) tri-cultius de iNKT:Treg:Tef. Les dades mostren la mitjana de tots els experiments realitzats (=4). Les diferències són estadísticament significatives (T-student; *p=0,05; ** p=0,005; *** p=0,001).

11

Discussió Capítol 2

Les malalties autoimmunitàries són el resultat d'un trencament de la tolerància a antígens propis, degut en part, a un desequilibri entre la resposta efectora i la resposta immunoreguladora. Entre les cèl·lules amb funció immunoreguladora, hi ha les cèl·lules Treg, que són essencials en el manteniment de la tolerància perifèrica i per tant, en la prevenció de les malalties autoimmunitàries. S'ha relacionat el desenvolupament de la T1D amb una baixa freqüència i una funció supressora deficient de les cèl·lules Treg [117]. Dades prèvies, on s'analitza la freqüència de cèl·lules Treg CD4+CD24^{high} a PBMCs de pacients amb T1D, van mostrar que el número circulant de cèl·lules Treg era significativament més baix a pacients que a controls [95,193, 194]. En el mateix context, d'altres estudis van mostrar una freqüència més baixa de cèl·lules T CD25⁺ a pacients més grans de 14 anys d'edat comparada amb controls, però no observable a pacients més joves (<14 anys) [195]. En canvi, d'altres estudis si van trobar una disminució de la població de cèl·lules Treg en nens amb diagnòstic recent/T1D [196,197]. Contràriament a aquestes dades, d'altres estudis no va mostrar diferències entre la freqüència de cèl·lules Treg a pacients i controls [198,199,117]. Les diferències trobades als diferents estudis podria estar relacionada amb l'etapa i el moment de desenvolupament de la T1D.

S'han dissenyat diferents mètodes d'immunoteràpia per restablir el nombre i la funció de les cèl·lules Treg i d'aquesta manera evitar o revertir la malaltia autoimmunitària. Aquests estudis han trobat un problema important a l'hora de dissenyar les diferents estratègies, que és la restricció per molècules MHC de classe II d'aquestes cèl·lules. Aquesta restricció suposa una limitació per la seva aplicabilitat, perquè les molècules MHC-II són molt polimòrfiques i per tant, obliga a un estudi individualitzat de l'element de restricció i els pèptids diana de la resposta. Per tant, s'han dissenyat protocols per a obtenir cèl·lules Treg, expandir-les *in vitro* i tornar-les a infondre al mateix pacient. Aquesta aproximació però té dos grans problemes: 1) la purificació de cèl·lules Treg és ineficient per l'absència de marcadors de superfície exclusius d'aquesta població cel·lular i, 2) aconseguir l'expansió *in vitro* d'un nombre suficient de cèl·lules per poder transferir al mateix pacient. Per tant, es va voler estudiar si les cèl·lules iNKT, considerades cèl·lules immunoreguladores i cèl·lules restringides per molècules de CD1, que no són polimòrfiques, podien ajudar a augmentar la capacitat supressora de les cèl·lules Treg i per tant, controlar la resposta autoimmunitària.

En els nostres estudis quan es va analitzar la funció supressora de les cèl·lules Treg, van mostrar que les Tregs d'individus sans suprimien la proliferació de les cèl·lules Tef, limitant la seva secreció d'IL-2, tal i com ja ha estat demostrat en estudis previs [200,201]. Els nostres resultats, van confirmar la necessitat del contacte cel·lular per les cèl·lules Treg per duu a terme la seva funció supressora, ja descrit en estudis anteriors [202,203]. Contràriament, les cèl·lules Treg de pacients amb T1D tenien menys capacitat per suprimir la proliferació de les cèl·lules Tef que les cèl·lules Treg d'individus sans, ja que es necessitaven de ràtios més alts de Treg:Tef per poder aconseguir valors similars de supressió. Concordant amb les nostres dades, d'altres estudis també va mostrar una activitat reguladora reduïda de les cèl·lules Treg a pacients amb T1D respecte les de controls [117]. En aquest estudi, es descriuen dos tipus de cèl·lules reguladores amb fenotip diferent, les cèl·lules Treg CD39⁺, amb funció reguladora i les cèl·lules Treg CD39⁻, amb capacitat supressora reduïda. La molècula de CD39 degrada l'ATP, l'ADP i l'AMP a adenosina, aquest efecte, pot provocar canvis immunològics de la resposta, passant de tenir una resposta immunitària pro-inflamatòria dirigida per AMP a ser anti-inflamatòria degut a l'adenosina. En aquest mateix context, diversos estudis han mostrat una freqüència de cèl·lules T CD39⁺ reduïda a individus amb T1D i d'altres malalties autoimmunitàries respecte individus sans [205,206,207]. Per tant, es podria pensar, que la baixa capacitat supressora de les cèl·lules Treg de pacients amb T1D observada en el nostre sistema, podria estar relacionada amb una disminució de la població de cèl·lules Treg CD39⁺, tal i com ja s'ha descrit en d'altres estudis en nens amb T1D [205]. Tampoc es pot excloure la possibilitat de tenir una barreja de cèl·lules Treg CD39⁺/CD39⁻, disminuint d'aquesta manera els nivells de supressió observats per cèl·lules Treg de pacients amb T1D. En aquest context, s'ha descrit, que les cèl·lules Treg CD39⁺ secreten IL-17A, però no les CD39⁻ [205]. Els nostres resultats van mostrar, que les cèl·lules Treg de pacients amb T1D, en el nostre sistema, no secretaven IL-17A. Per tant, es podria especular que si la freqüència de cèl·lules Treg CD39⁺ és baixa freqüència, els nivells de IL-17A estaran reduïts, desfavorint la supressió per cèl·lules Treg de pacients amb T1D. Tot i així, tampoc es pot excloure que la secreció d'IL-17 sigui un mecanisme de regulació utilitzat per les cèl·lules Treg per duu a terme la seva funció supressora.

Estudis més recents, han suggerit la possibilitat de l'existència de cèl·lules Tef refractàries a la regulació en malalties autoimmunitàries [208]. Els nostres resultats van mostrar, que les cèl·lules Treg d'individus sans tenien més dificultats per suprimir la proliferació de les cèl·lules Tef de pacients amb T1D que suprimint la proliferació de les Tef autòlogues i/o al·logèniques d'individus sans. L'anàlisi de citocines va mostrar que les cèl·lules Tef de pacients amb T1D feien alts nivells de citocines pro-inflamatòries,

IFN γ i TNF α i baixos nivells de citocines reguladores comparats amb els observats a individus sans. Aquestes dades podrien suggerir, que les cèl·lules Tef dels pacients amb T1D són resistents a la supressió per les Tregs degut a la seva secreció de citocines pro-inflamatòries, desequilibrant el balanç de la resposta Th1/Th2. Aquestes dades concorden amb estudis previs realitzats a pacients amb Múltiple Esclerosi, on es va observar que les cèl·lules Tef d'aquests pacients secretaven grans quantitats de citocines pro-inflamatòries (IFN γ , TNF α i IL-2) que afavorien la seva hiperproliferació i per tant, es feien resistents a la regulació per les cèl·lules Treg [117]. Els nostres resultats van mostrar grans nivells d'IFN γ secretats per les cèl·lules Tef de pacients amb T1D comparat amb la resta de citocines secretades. L'IFN γ , està implicat en la destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques mitjançant cèl·lules T, ja que les cèl·lules T autoreactives dirigides contra els illots pancreàtics es caracteritzen per la secreció d'aquesta citocina a pacients amb T1D [209,210]. Així, el microambient generat al pàncrees durant la resposta inflamatòria fa que les cèl·lules Tef dels pacients canviïn el seu patró de citocines generant una resposta més de tipus Th1 i d'aquesta manera escapar a la regulació per les cèl·lules Treg.

Ja que les nostres dades van mostrar que les cèl·lules Treg dels pacients amb T1D tenien una baixa capacitat supressora comparada amb l'observada a individus sans i que les cèl·lules iNKT tenien funció immunoreguladora, es va estudiar si aquestes podien potenciar la capacitat supressora per les cèl·lules Treg.

Els nostres resultats van mostrar que afegint números creixents de cèl·lules iNKT en els cocultius de cèl·lules Treg:Tef, augmentaven els nivells de supressió de la proliferació cel·lular, per tant, suggerien que les cèl·lules iNKT tenien un efecte adjuvant de la supressió per les cèl·lules Treg. Aquest resultat contrastava amb els d'un estudi on es demostrava que les cèl·lules Treg CD4⁺CD25⁺ humanes suprimien la funció de les cèl·lules iNKT [211]. Però, en canvi, concordava amb un estudi més recent on s'analitzava la possible interacció entre cèl·lules iNKT i cèl·lules Treg en transplantament combinat d'òrgan i medul·la òssia [212]. Aquest estudi va demostrar que les cèl·lules iNKT podien regular la secreció d'IL-10 per cèl·lules Treg en ratolins transplantats i que les cèl·lules iNKT augmentaven l'expressió de PD-1 a les cèl·lules Treg i per tant, disminuïen l'activació de les cèl·lules T.

Tal com s'ha esmentat al [capítol 1](#), el mecanisme supressor per les cèl·lules iNKT depenia de la secreció d'IL-13. Per tant, es va voler estudiar, si aquesta i d'altres citocines reguladores podien ser les responsables de l'efecte adjuvant per les cèl·lules iNKT. Els nostres resultats van mostrar que la IL-13 era una de les citocines responsables de l'efecte adjuvant per les cèl·lules iNKT. La presència de cèl·lules iNKT als cocultius de Treg:Tef no només augmentava els nivells d'IL-13, sinó que també col·laboraven amb l'aportació de baixos nivells d'IL-4 i IL-10. Concordant amb les nostres dades, estudis previs van mostrar que la IL-10 secretada per les cèl·lules iNKT podria interferir en la diferenciació de cèl·lules Treg específiques d'antigen [213]. Contràriament als nostres resultats, diversos estudis on s'estudiaven els possibles mecanismes immunoreguladores de les cèl·lules iNKT per bloquejar una línia cèl·lules T diabetogèniques (BDC2.5), van suggerir que citocines com IL-4, IL-10, IL-13 i TGF β , no eren necessàries per a inhibir la diferenciació de les cèl·lules T diabetogèniques en condicions *in vitro* per les cèl·lules iNKT [149]. Tot i així, no es pot excloure el paper de determinats factors solubles en l'efecte adjuvant de les cèl·lules iNKT.

Ja que diferents estudis havien demostrat la necessitat del contacte cèl·lula- cèl·lula per a la regulació per cèl·lules Treg [214,215,216] es va estudiar si l'efecte adjuvant de les cèl·lules iNKT era dependent o no de contacte. Els nostres resultats utilitzant sistemes de cultiu transwell, van mostrar que l'efecte adjuvant per les cèl·lules iNKT era independent de contacte cel·lular. Així, la secreció de citocines reguladores per les cèl·lules iNKT com efecte adjuvant de la supressió, no depenia de contacte cel·lular en el nostre sistema de cultiu. Tot i així, no es pot excloure que el contacte cel·lular sigui un dels mecanismes utilitzats per les cèl·lules iNKT per duu a terme la seva funció adjuvant, ja que estudis previs van demostrar la necessitat del contacte cel·lular en un sistema concret, entre cèl·lules iNKT i cèl·lules T diabetogèniques BDC2.5 per inhibir la diferenciació i proliferació d'aquestes [147]. Així, els nostres resultats van contrastar amb els mecanisme de supressió descrits per cèl·lules Treg, on diversos van mostrar la necessitat del contacte cel·lular [1, 155].

Per tant, aquests resultats són interessants, perquè obre un possible mecanisme d'immunoteràpia usant iNKT com a adjuvants de la funció immunoreguladora de les cèl·lules Treg, col·laborant amb l'aportació de citocines de caràcter regulador i reduint els problemes d'histocompatibilitat observats amb l'ús en immunoteràpia de cèl·lules Treg.

Resultats Capítol 3

Dinàmica de la infiltració de cèl·lules reguladores al pàncrees de pacients amb Diabetis Tipus 1

Background

La disposició de les cèl·lules que formen part dels illots pancreàtics a humans i ratolins es ben diferent. En ambdós casos, les cèl·lules predominants dels illots pancreàtics són les cèl·lules β productores d'insulina. A ratolins, les cèl·lules β s'agrupen al centre de l'illot, generalment rodó, i la resta de cèl·lules, α , δ i PP, es col·loquen formant un mantell a nivell perifèric que els envolta, no observable a pàncrees humà. Així, a ratolins s'observa una clara separació entre els diversos tipus cel·lulars a diferents regions de l'illot pancreàtic, la qual cosa fa pensar que hi ha una certa subdivisió anatòmica. Contràriament, a humans, la distribució de les cèl·lules als illots pancreàtics és ben diferent, ja que els diferents tipus cel·lulars es troben distribuïts sense cap ordre o disposició determinada a l'interior dels illots pancreàtics. La localització dels illots a les tres regions del pàncrees (cap, cos i cua) és similar, tot i que hi ha estudis on s'ha observat que a nivell del coll, els illots contenen més quantitat de cèl·lules α que a la resta de regions [25]. Les cèl·lules iNKT són cèl·lules restringides per molècules de CD1 i per tant, reconeixen antígens lipídics. Les cèl·lules iNKT són considerades cèl·lules immunoreguladores degut a la seva capacitat de secreció ràpida de citocines un cop són activades així com per la seva capacitat d'interacció i modulació de la funció d'altres tipus cel·lulars del sistema immune. Les cèl·lules Treg són cèl·lules T restringides per molècules de MHC de classe II i per tant, reconeixen antígens peptídics, i es caracteritzen per la secreció de citocines reguladores així com la seva capacitat de supressió de la proliferació de cèl·lules Tef. Una baixa freqüència i un defecte en la funció d'aquests dos tipus cel·lulars, tant a pacients amb T1D com en model de ratolins NOS, ha estat descrita a diferents malalties autoimmunitàries, entre elles la T1D. El fet de que diversos estudis hagin suggerit la presència de cèl·lules T a pàncrees humans al debut de la malaltia [217, 218] i el fet de que tal i com hem demostrat al [capítol 2](#), les cèl·lules iNKT tenen un efecte adjuvant sobre la funció supressora produïda per les cèl·lules Treg, fa, que estudiar la presència i localització d'ambdós tipus cel·lulars a l'òrgan diana de la resposta immunitària aportí noves dades sobre nous autoantígens que podrien ser reconegut *in situ* durant la resposta autoimmunitària al pàncrees.

Així, en aquest capítol s'analitza la presència i la localització de cèl·lules iNKT i de les cèl·lules Treg a l'òrgan diana de la resposta autoimmunitària en diferents estadis del desenvolupament de la T1D a humans i a ratolins NOD, així com les seves conseqüències funcionals.

C3. 1.Presència de cèl·lules reguladores al pàncrees humà: cèl·lules iNKT i Tregs infiltrants al pàncreas d'un pacient amb T1D.

Es va estudiar la presència de cèl·lules T amb capacitat per regular la funció de les cèl·lules T autoreactives a l'òrgan diana de l'autoimmunitat a la T1D, així com les cèl·lules iNKT i les cèl·lules Treg. Per això, es va analitzar una mostra de pàncrees d'un pacient que va morir al debut de la T1D (Cas 1), l'únic cas en el que s'ha pogut estudiar amb detall la immunohistopatologia del debut de la T1D [142]. Es va poder estudiar una mostra de teixit pancreàtic total (TT), una mostra d'illots pancreàtic purificats (ILL) i una mostra de melsa (M) del mateix pacient. Com a control es va poder analitzar una mostra d'illots pancreàtics purificats d'un control sà (ILL) (control 7) [143]. Per estudiar les cèl·lules T reguladores, el primer que es va fer és determinar la quantitat de cèl·lules T infiltrants al teixit, a partir de l'expressió de CD3 γ per qPCR. El resultat, segons l'expressió relativa calculant el ràtio CD3 γ /GAPDH, va indicar uns nivells similars de cèl·lules T infiltrats a la fracció d'illots pancreàtics del Cas 1 i a la mostra control, tal i com ja havia estat descrit prèviament [142] (Fig. 1). Tal i com s'esperava, l'expressió de CD3 γ a la melsa (M), va ser superior a la de la fracció d'illots pancreàtics purificats (ILL) i teixit total (TT) del mateix pacient, així com també superior als nivells observats a la mostra control. No es van trobar diferències significatives en el nivell d'infiltració de cèl·lules T a TT i ILL al pàncrees del pacient, indicant l'existència de cèl·lules T, tant al teixit endocrí com a l'exocrí. Més sorprenent va ser, que els nivells de cèl·lules T CD3⁺ a TT i ILL del pacient van ser comparables als dels ILL de la mostra control, indicant la presència de cèl·lules T infiltrants també al pàncrees de controls sans i més concretament als illots pancreàtics.

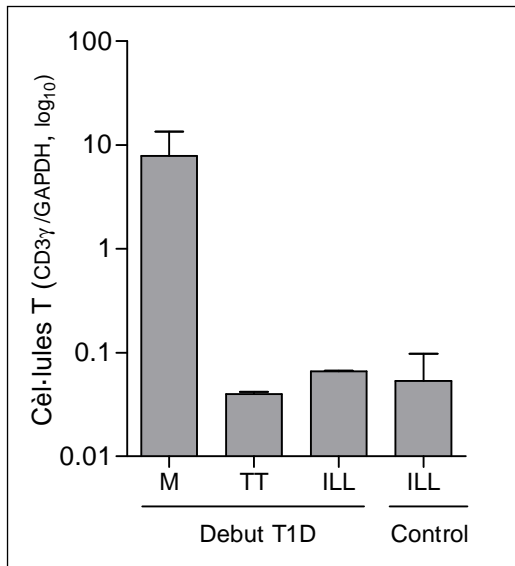


Figura 1. Determinació de la quantitat de cèl·lules T a una mostra d'un pacient amb T1D al debut (Cas 1). Anàlisi per Real Time PCR (qPCR) calculant el ràtio CD3 γ /GAPDH per a determinar la quantitat de cèl·lules T totals a l'infiltrat de mostres pancreàtiques d'un pacient amb T1D al debut (Cas 1) i a una mostra control d'illots pancreàtics d'un individu sà, (Control 7). M, melsa; TT, teixit pancreàtic total; ILL, illots pancreàtics aïllats i purificats.

Quan es va analitzar la infiltració de les cèl·lules iNKT a les mateixes mostres, el resultat va ser diferent. La presència de cèl·lules iNKT, es va determinar a partir de l'expressió del mRNA de la cadena α del TCR invariant, V α 24J α 18, normalitzada amb l'expressió de CD3 γ . Els resultats van mostrar que hi havia cèl·lules iNKT al pàncrees del pacient amb T1D, tant al teixit total com a la fracció d'illots purificats. Aquestes cèl·lules eren més abundants al pàncrees que a la melsa del mateix pacient. Si tenim en compte l'alta freqüència de cèl·lules T a la melsa del pacient amb T1D (Fig. 1), aquest resultat indicaria que una proporció molt important de cèl·lules T infiltrants del pàncrees corresponen a cèl·lules iNKT. A més, era destacable l'expressió del TCR V α 24J α 18 als illots del pacient amb T1D mentre que era gairebé indetectable als illots de la mostra control. El resultat més significatiu va ser que la freqüència de cèl·lules iNKT era més alta a la mostra de teixit total que a la resta de mostres del mateix pacient (Fig. 2). De fet, la quantitat de cèl·lules iNKT al teixit total va ser unes 20 vegades més alta que als ILL del mateix pacient, indicant una major presència de cèl·lules iNKT al teixit exocrí. Tot i que no va ser possible la comparació amb la mostra de teixit total del pàncrees control per falta de material, és important tenir en compte que l'expressió del TCR V α 24J α 18 en els illots del pàncrees control era 200 vegades més baixa que la del teixit total del pacient (Fig. 2).

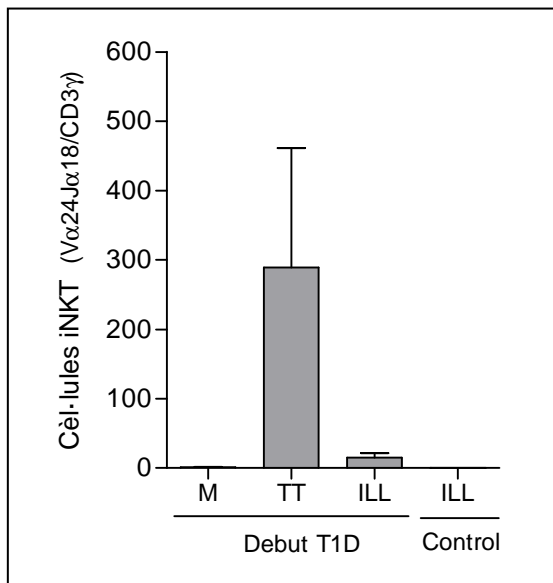


Figura 2. Quantificació de cèl·lules iNKT a les mostres del pacient amb T1D al debut. Quantificació per Real Time PCR (qPCR) de l'expressió del reordenament del TCR específic de les cèl·lules iNKT (Vα24Jα18) a les mostres del pacient amb T1D (Cas 1) i a la mostra control (Control 7). M, melsa; TT, teixit pancreàtic total; ILL, illots pancreàtics aïllats i purificats.

Aquest resultat van indicar que les cèl·lules amb un fenotip de cèl·lula iNKT són presents en el pàncrees al debut clínic de la malaltia i degut a la seva major freqüència a la mostra de teixit total, estan preferentment localitzades fora dels illots pancreàtics, al teixit exocrí (TT).

També vam estudiar la presència de cèl·lules Treg a les mateixes mostres. L'anàlisi de la Fig. 3 mostra que: (a) aquesta població de cèl·lules immunomoduladores es trobava al pàncrees del pacient amb T1D al debut, tant al teixit total com a la fracció d'illots purificats; (b) l'expressió de Foxp3 va ser més alta als illots pancreàtics dels pacients amb T1D que a la resta de mostres analitzades; (c) l'abundància relativa de Foxp3 als illots pancreàtics del pacient amb T1D va ser 5 vegades més alta que al teixit total, indicant que les cèl·lules Treg estaven concentrades preferentment al teixit endocrí; (d) la presència relativa de cèl·lules Treg a la melsa del pacient amb T1D va ser entre 66-100 vegades més baixa que al pàncrees; i (e) les cèl·lules Treg també eren presents als illots del pàncrees control, encara que amb una expressió relativa menor que als illots del pacient, suggerint que les cèl·lules Treg podrien ser residents del teixit pancreàtic a controls sans.

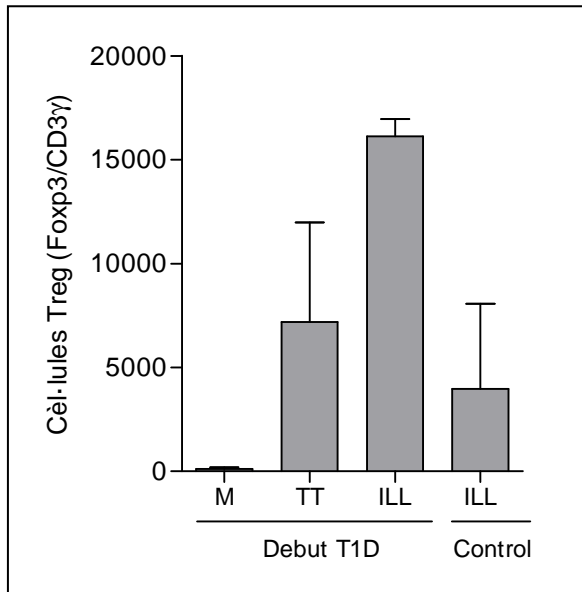


Figura 3. Quantificació de cèl·lules Treg a mostres de pacients amb T1D al debut (Cas 1). Quantificació per Real Time PCR (qPCR) de l'expressió de Foxp3 a les mostres d'un pacient amb T1D (Cas 1) i una mostra control (Control 7), calculant el ràtio Foxp3/CD3 γ . M, melsa; TT, teixit pancreàtic total; ILL, illots pancreàtics aïllats i purificats.

Aquestes dades, mostren la presència de cèl·lules iNKT i cèl·lules Treg al pàncrees del pacient amb T1D al debut de la malaltia. Això podria ser el resultat del seu reclutament o de la expansió *in situ* d'aquestes poblacions cel·lulars a l'òrgan diana de la resposta autoimmunitària.

Per a confirmar la presència de les cèl·lules iNKT i Tregs al pàncrees humà, es va fer un anàlisi d'immunofluorescència sobre seccions de teixit pancreàtic humà de pacients amb T1D. Es va analitzar l'expressió d'insulina per poder localitzar els illots pancreàtics, així com de Foxp3 i TCRV α 24J α 18 per a detectar cèl·lules Treg i cèl·lules iNKT respectivament.

A la Fig. 4a s'observa el patró de tinció obtingut pel TCR V α 24J α 18 específic de les cèl·lules iNKT. Tal i com s'observa, la tinció del TCR és una tinció de membrana on es veu marcatge al voltant de la cèl·lula. En canvi, a la Fig. 4b s'observa la tinció per Foxp3. Com el Foxp3 és un factor de transcripció, aquest es troba majoritàriament al nucli i per tant, el patró de tinció que s'observa és un patró de tinció nuclear.

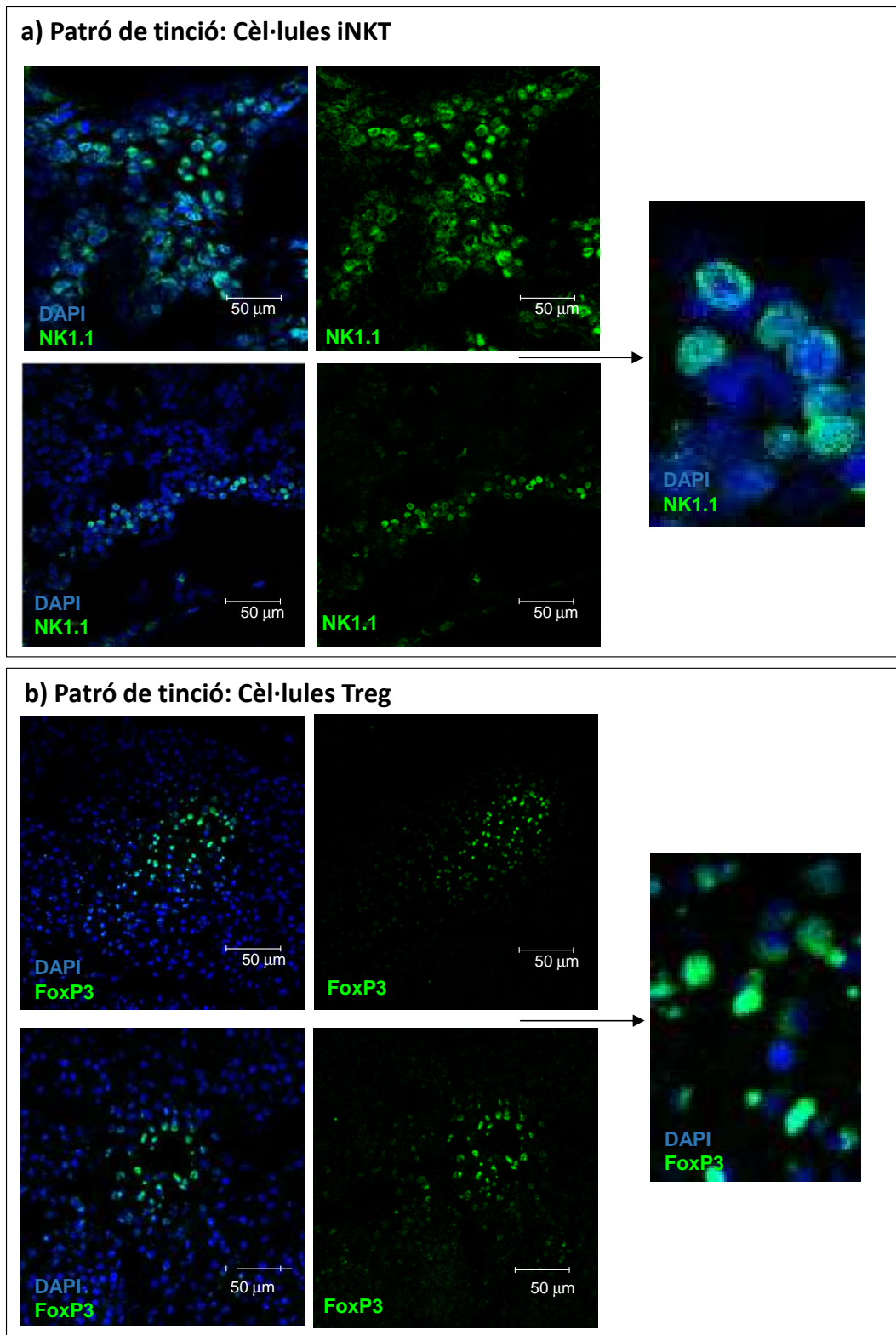


Figura 4. (a) Patró de tinció del TCR de les cèl·lules iNKT a humans. La tinció pel TCR $V\alpha 24J\alpha 18$ és una tinció de membrana on el marcatge s'observa al voltant de la cèl·lula. **(b) Patró de tinció de Foxp3 a humans.** La tinció del factor de transcripció Foxp3 és una tinció nuclear. Les imatges mostren dos exemples de cada tipus de tinció i una ampliació del patró de marcatge en cada cas (dreta). TCR $V\alpha 24J\alpha 18$ i/o Foxp3 (Verd); Dapi (Blau).

Tal i com es pot observar a la Fig. 5, l'anàlisi d'immunofluorescència de diferents seccions de teixit pancreàtic humà en diferents fases del desenvolupament de la T1D; (Controls (PanH#6098; 17 anys d'edat), Debut (PanH#6113; 1 setmana d'evolució) i T1D de llarga durada (PanH#6046 8 anys d'evolució) va mostrar uns nivells d'infiltració cel·lular molt baixos en totes les etapes analitzades comparats als descrits prèviament a ratolins NOD [27]. D'una banda, la tinció a mostres de seccions pancreàtiques a controls, va mostrar que els illots estaven intactes i els nivells d'infiltració eren escassos (Fig. 5a). Només es van poder detectar alguna cèl·lula iNKT i/o Treg fóra dels illots pancreàtics.

A l'etapa del debut (Fig. 5b) la majoria dels illots pancreàtics encara estaven intactes però la freqüència de cèl·lules iNKT va augmentar. L'augment de la freqüència va ser dèbil i les cèl·lules continuaven estant localitzades fóra dels illots pancreàtics. Respecte les cèl·lules Tregs, aquestes també van augmentar en freqüència i va ser més elevada comparada amb la de les cèl·lules iNKT. A més a més, la seva distribució a pàncrees, va canviar respecte als controls, ja que en aquest cas, les cèl·lules Treg estaven localitzades a la perifèria dels illots pancreàtics i fins i tot al seu interior.

Finalment, a la mostra de pacients amb T1D de llarga durada (Fig. 5c), va ser difícil trobar illots positius per la insulina, tot i que en algun cas si que en van trobar. En aquest cas, els nivells d'infiltració van ser variables entre seccions analitzades, ja que hi havia seccions on els nivells d'infiltració eren escassos i on es van trobar poques cèl·lules iNKT i Tregs distribuïdes al teixit, però a d'altres seccions, en canvi, els nivells d'infiltració van ser més elevats.

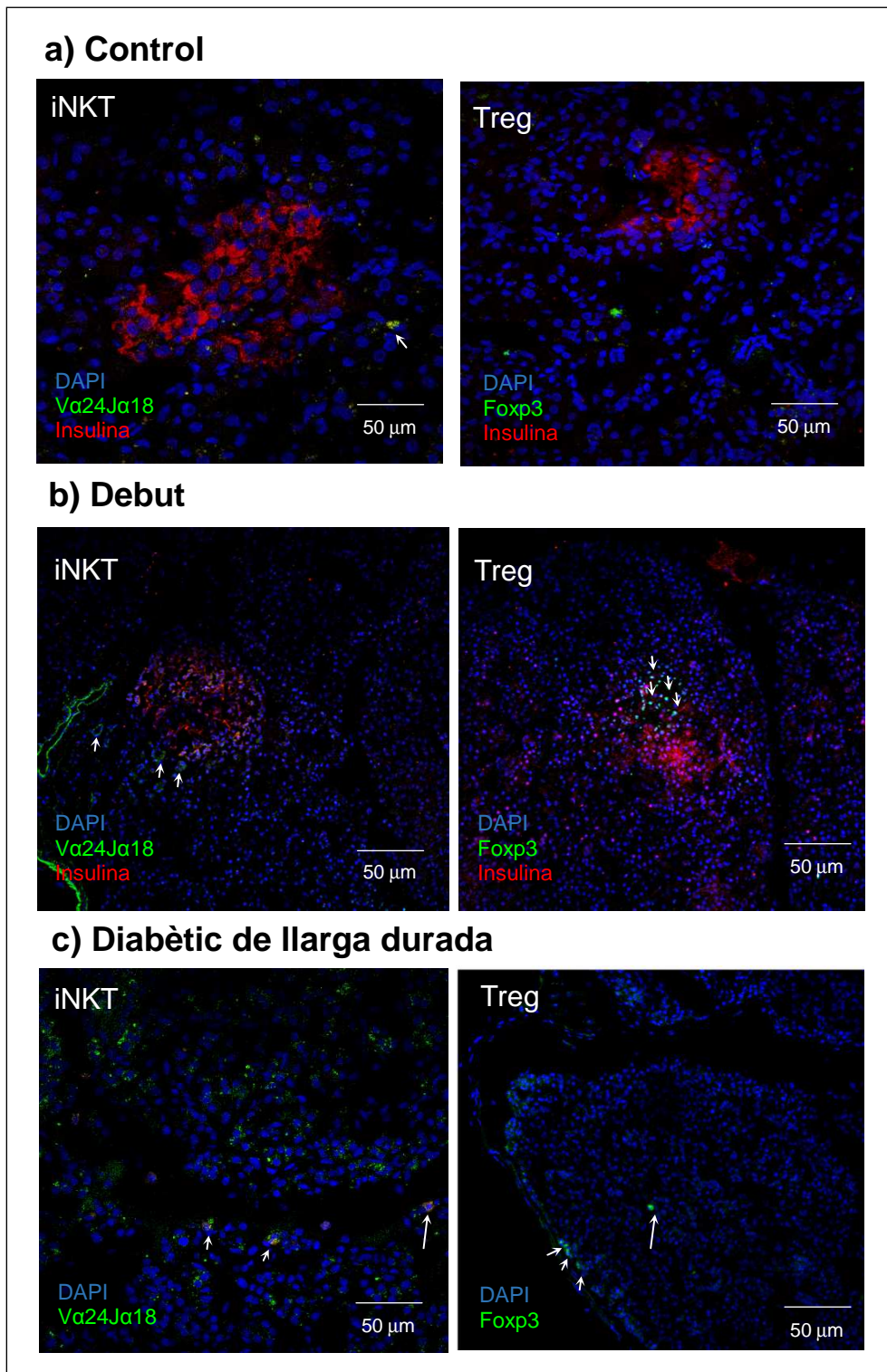


Figura 5. Anàlisi de cèl·lules iNKT i Tregs a pàncrees humà en diferents etapes del desenvolupament de la T1D. Les cèl·lules iNKT i Treg van ser detectades per immunofluorescència a seccions de pàncrees humà a; Controls (nPOD#6098; 17 anys d'edat); debut (nPOD#6113; 1 setmana d'evolució) i T1D de llarga durada (nPOD#6046; 8 anys d'evolució) usant anticossos monoclonals específics per cada població cel·lular; TCR α 24J α 18 (Verd) per les cèl·lules iNKT, Foxp3 (Verd) per les cèl·lules Treg. En tots els casos es va usar la insulina (Vermell) pel marcatge dels illots pancreàtics i Dapi (Blau) per la tinció nuclear.

C3. 2. Les cèl·lules iNKT i Treg aïllades del pàncreas d'una pacient amb T1D eren funcionals

Per confirmar que les cèl·lules detectades al pàncreas de pacient amb T1D eren cèl·lules iNKT i Treg i no cèl·lules T efectores (Tef) que expressaven el TCR invariant o Foxp3 degut al seu estat d'activació, es van aïllar i expandir cèl·lules d'aquestes dues poblacions a partir dels limfòcits intrapancreàtics (IPLs) del Cas 1 i es va analitzar la seva funcionalitat. Per a l'obtenció de cèl·lules iNKT, els IPLs van ser inicialment expandits *in vitro* amb anti-CD3, seguit d'un cicle d'estimulació amb α GalCer. L'anàlisi del fenotip de les cèl·lules resultants va demostrar l'expansió de cèl·lules $V\alpha 24J\alpha 18^+V\beta 11^+CD4^+$ que representaven un 88,4 % de la població total (Fig. 6a). Es va comprovar que aquestes cèl·lules eren iNKT, ja que el 90% de les cèl·lules $V\alpha 24^+CD3^+$ unien específicament i per tant es marcaven, amb un tetràmer de CD1d carregat amb l' α GalCer, el lligand reconegut pel TCR invariant de les cèl·lules iNKT (Fig. 6b). En canvi, no es marcaven amb tetràmers de CD1d sense carregar (sense α GalCer), usats com a control negatiu.

L'expansió de cèl·lules iNKT funcionals des dels IPLs va confirmar la presència d'aquesta població al pàncreas del pacient amb T1D al debut (Cas 1), dades que confirmaven els resultats obtinguts per qPCR i per immunofluorescència.

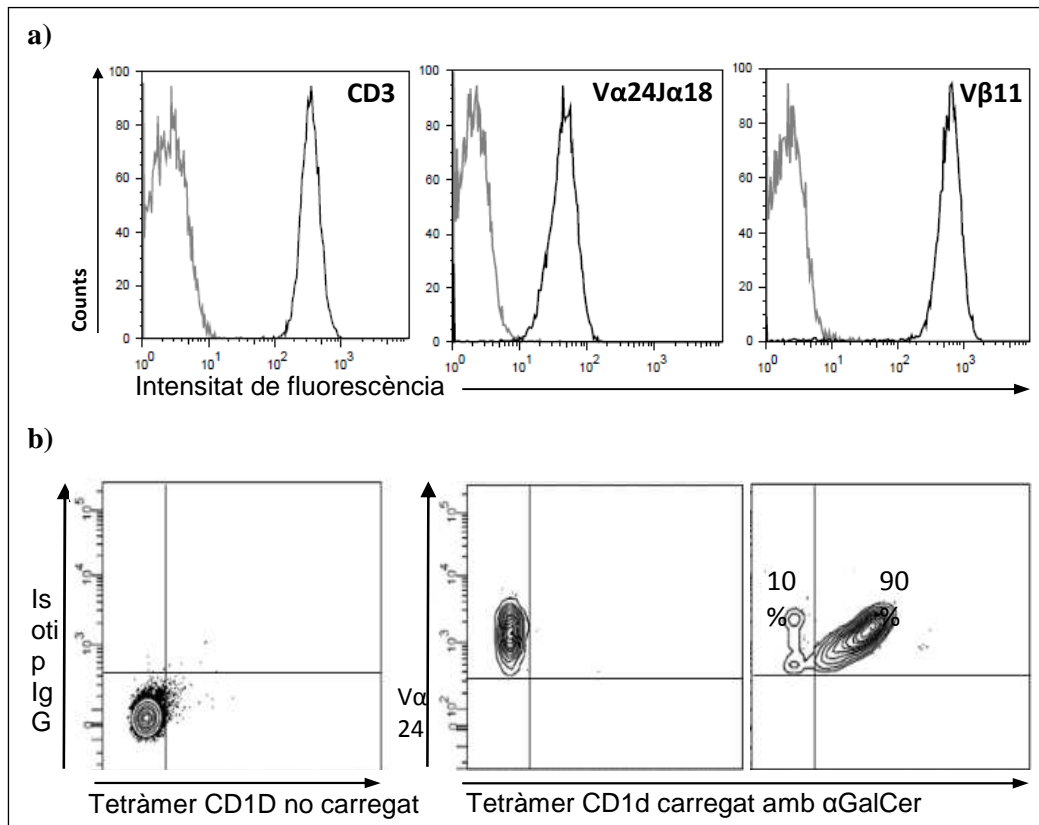


Figura 6. Les cèl·lules Vα24Jα18 aïllades del pàncreas del Cas 1 són cèl·lules iNKT funcionals. a) Fenotip de les cèl·lules iNKT aïllades a partir dels IPLs del pàncreas del cas 1. Anàlisi per citometria de flux b) Anàlisi de l'especificitat de les cèl·lules iNKT amb tetràmers de CD1d carregats amb αGalCer. L'anàlisi per citometria de flux mostra la població de cèl·lules CD3⁺Vα24⁺ tenyides amb tetràmers de CD1d sense carregar (esquerra) o carregats amb l'anàleg de l'αGalCer, PBS-57 (central i dreta).

A part de cèl·lules iNKT i com a part de la tesi doctoral de Manuela Costa, un clon (.2i) de cèl·lules Treg (CD4⁺ Foxp3⁺) i un clon de cèl·lules Tef (.29) (CD4⁺ Foxp3⁻) van ser aïllats des dels IPLs del Cas 1. Per confirmar el fenotip de cada una de les poblacions aïllades, es va fer una tinció amb anticossos monoclonals específics i es va analitzar per citometria de flux, tal i com s'observa a la Figura 7a. Els resultats van mostrar que el clon .2i tenia un fenotip regulador i el clon .29 presentava un fenotip de caràcter efector. Un cop comprovat el fenotip d'ambdós poblacions cel·lulars, es va testar la seva capacitat supressora fent assajos de proliferació i supressió *in vitro* utilitzant diferents combinacions; (a) usant el clone .2i com a regulador i PBMCs al·logènics com a cèl·lules Tef (Fig. 7b). En aquest cas, els resultats van mostrar clarament que el clon .2i suprimia la proliferació dels PBMCs al·logènics. La supressió incrementava d'una manera dosi depenent, quan el ràtio Treg clon.2i vs PBMCs al·logènics incrementava, arribant a una supressió aproximadament del 60% utilitzant un ràtio 1:1 i arribant a tenir nivells de proliferació del 13,2% utilitzant un ràtio 2:1. Les anàlisi estadístics utilitzant una T-student van mostrar diferències estadísticament significatives tal i com es pot observar a la Fig.7b (* p<0.05; ** p<0.005). (b) En un segon cas, el clon .29 es va

usar com a regulador i els PBMCs al·logènics com a cèl·lules Tef (Fig. 7c). En aquest cas, el clon .29 tal i com va mostrar el seu fenotip (CD4⁺Foxp3⁻) no va mostrar capacitat supressora, ja que no era capaç d'inhibir la proliferació dels PBMCs al·logènics a cap dels ràtios .29:PBMCs utilitzats a l'assaig. Els resultats no van ser estadísticament significatius i els nivells de proliferació eren d'un 60-70 % utilitzant ràtios .29:PBMCs 1:1 i/o 2:1. (c) Finalment, també es va comprovar si el clon .2i podia suprimir la proliferació del clon .29 (Fig. 7c). El resultat va demostrar que el clon.2i podia suprimir la proliferació del .29 tot i que, els nivells de supressió van ser més baixos que quan es van posar en cocultiu el clon .2i amb els PBMCs al·logènics. En aquest cas, utilitzant un ràtio 1:1 s'aconseguia una % de supressió aproximadament del 50%. Les anàlisis estadístics fent una T-student van mostrar diferències estadísticament significatives (* p<0.05).

Així, aquestes dades, confirmen la presència de cèl·lules iNKT i de Tregs funcionals al pàncrees d'un pacient amb T1D al debut de la malaltia (Cas 1). Es important destacar, que tot i que a pàncrees humana es troba poca infiltració, les cèl·lules iNKT i Tregs aïllades i expandides *in vitro*, van mantenir la seva capacitat funcional.

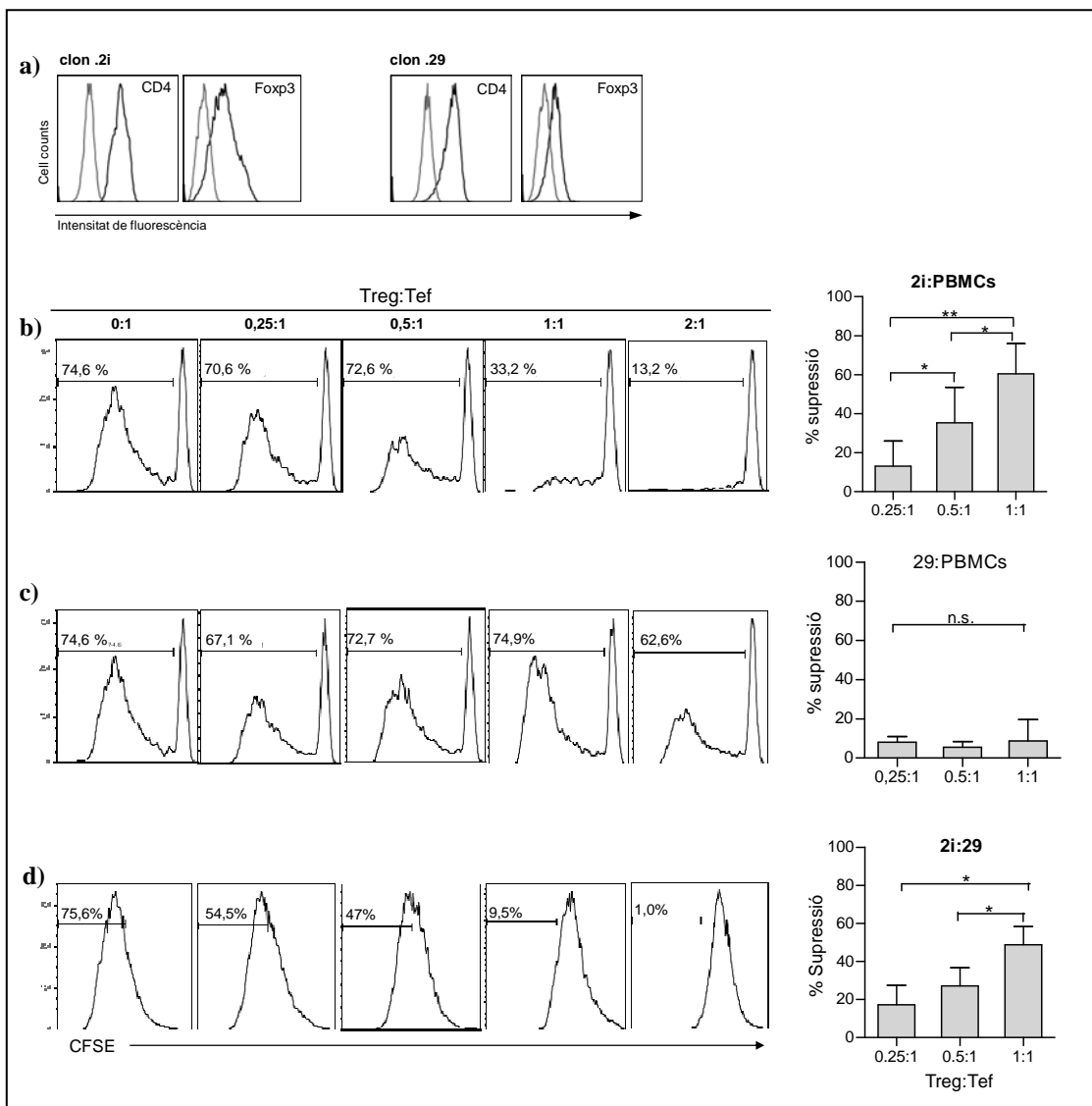


Figura 7. Cèl·lules Treg aïllades d'IPLs del pacient del Cas 1 tenen capacitat supressora. (a) Fenotip del clon de Treg .2i ($CD4^+Foxp3^+$) i del clon .29 ($CD4^+Foxp3^-$) analitzat per citometria de flux. (b,c,d) La capacitat supressora dels clons de cèl·lules T van ser testats en contra de la proliferació de PBMCs al·logènics i entre ells. En tots els casos, la proliferació es va mesurar per tinció amb CFSE usant diferents ràtios Treg:Tef i analitzant els resultats per citometria de flux. Els histogrames mostren un exemple dels 3 experiments realitzats. El gràfic de barres (dreta) mostra la mitjana del % de supressió de tots els experiments realitzats ($n=3$). (b) El clon .2i suprimeix la proliferació dels PBMCs al·logènics aconseguint un % de supressió del 60,3% usant un ràtio 1:1 de Treg:Tef. Les anàlisis estadístics usant una T-student va mostrar diferències estadísticament significatives; (c) el clon de Tef .29 no va suprimir la proliferació dels PBMCs al·logènics. L'anàlisi estadística usant una T-student van mostrar diferències significatives. (* $p<0.05$; ** $p<0.005$). (Tesi Doctoral Manuela Costa).

C3. 3. Dinàmica de la infiltració de cèl·lules iNKT i Tregs en el pàncrees humà durant la progressió de la T1D

Després de confirmar la presència de cèl·lules iNKT i Tregs funcionals al pàncrees de pacients amb T1D al debut de la malaltia, es va voler estudiar si aquesta presència es mantenia durant les diferents etapes del desenvolupament de la T1D i amb quina freqüència. Per duu a terme aquest estudi, es va analitzar l'mRNA extret de seccions de teixit pancreàtic total d'un control (Cas nPOD#6098, 17 anys d'edat), un pacient amb T1D al debut (Cas nPOD#6113, 1 setmana d'evolució) i un pacient amb T1D de llarga-evolució (Cas nPOD#6046, 8 anys d'evolució) per PCR convencional. Per a confirmar l'estat de cadascuna de les mostres, es va analitzar l'expressió de gens específics de cèl·lules endocrines del pàncrees (INS-insulina i PPY- Polipèptid pancreàtic) i de la cèl·lules exocrines (PNLIP, lipasa pancreàtica) i es va usar l'expressió d'hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa 1 (HPRT1) com a gen d'expressió constitutiva (housekeeping) per a la normalització de les dades.

Els resultats van mostrar, tal i com s'esperava, una disminució progressiva en l'expressió d'insulina des del pàncrees control al debut de la T1D i sobretot al pàncrees del pacient amb T1D de llarga evolució, seguint probablement a la disminució de la freqüència de cèl·lules β productores d'insulina que té lloc durant el desenvolupament de la diabetis (Fig. 8a). Les anàlisis estadístiques usant una T-student van mostrar diferències estadísticament significatives entre la quantitat d'insulina a controls vs debut, $p=0,0476$; controls vs T1D de llarga durada, $p=0,0040$ i debut vs T1D de llarga durada, $p=0,0159$. En canvi, l'expressió de PPY era menor a les mostres dels pacients (debut i T1D) però sense canvis a mesura que augmentava el temps d'evolució. Aquest resultat confirmava que la resposta autoimmunitària al pàncrees és majoritàriament específica de cèl·lules β i el dany a la resta de cèl·lules pancreàtiques no augmenta una vegada s'estableix la malaltia (Fig. 8b). En qualsevol cas, les diferències en l'expressió de PPY entre les mostres no van ser estadísticament significatives. Finalment, l'expressió de PNLIP també va ser menor en les mostres de T1D comparat amb la mostra control, el que indica una pèrdua generalitzada de teixit pancreàtic, endocrí i exocrí, en el pàncrees humà després del debut de la T1D (Fig. 8c). Les anàlisis estadístiques usant una T-student van mostrar diferències estadísticament significatives en l'expressió d'aquest gen entre control i pacients (control vs debut, $p=0,0500$; control vs T1D, $p=0,0500$).

Tot seguit, es va analitzar la freqüència de cèl·lules iNKT i Tregs al pàncrees d'aquests pacients i control per PCR convencional basant-nos en l'expressió del TCRV α 24J α 18 i de Foxp3 per a cèl·lules iNKT i Treg respectivament. Els resultats van mostrar que els nivells de cèl·lules iNKTs, mesurats com l'expressió relativa de TCRV α 24J α 18 respecte de CD3 γ , van augmentar a la mostra de debut de la malaltia respecte del control, però van disminuir significativament a la mostra de T1D de llarga evolució. En aquesta mostra la freqüència de cèl·lules iNKTs va ser fins i tot més baixa que a la mostra control (Fig. 9a). La presència de cèl·lules Treg a les mateixes mostres va seguir un patró similar al de les cèl·lules iNKT, però diferent a nivell de freqüència. La freqüència de cèl·lules Tregs va ser similar a la mostra control i de debut de T1D, però gairebé indetectables a la mostra de T1D de llarga evolució (Fig. 9b). Les dades obtingudes a les mostres de T1D al debut concorden amb els resultats obtinguts al Cas 1 (Fig. 1 – 3), on es veu que ambdues poblacions de cèl·lules reguladores estan augmentades a les primeres etapes del desenvolupament de la malaltia. És especialment interessant que a les etapes més tardanes de la malaltia (pacient amb 8 anys d'evolució), aquests dos principals components cel·lulars del compartiment de regulació, les cèl·lules iNKT i Tregs, tendeixen a desaparèixer del pàncrees.

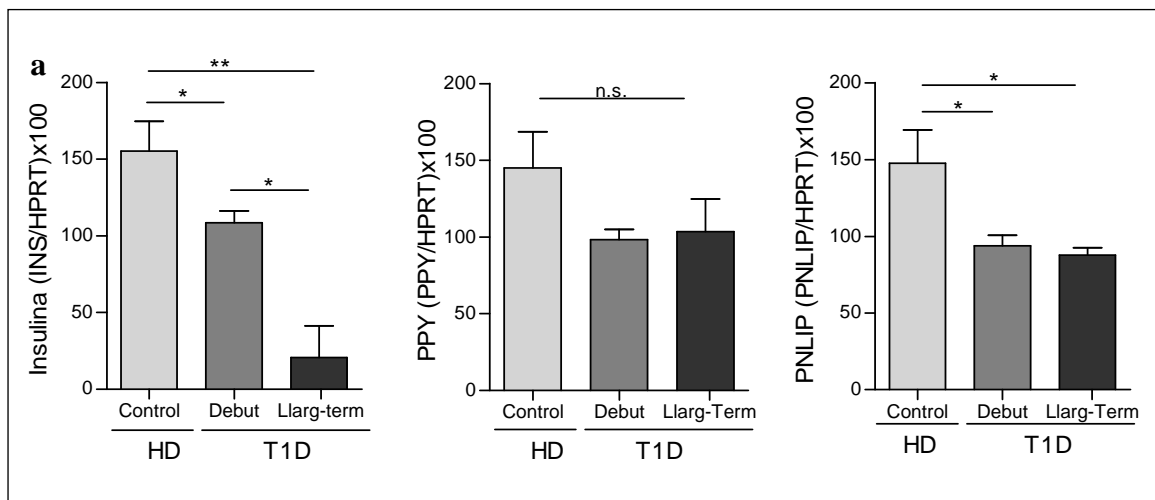


Figura 8. Comprovació de l'estat i de l'etapa de desenvolupament de la T1D. Anàlisi de l'expressió de a) insulina (INS); b) polipèptid pancreàtic (PPY) i c) lipasa pancreàtica (PNLIP) analitzada per PCR convencional i quantificació per densitometria de les bandes obtingudes. mRNA extret de seccions de teixit pancreàtic de mostres de pacients al debut (nPOD#6113, 1 setmana d'evolució) i T1D de llarga evolució (nPOD#6046, 8 anys d'evolució), així com també d'una mostra control (nPOD#6098, 17 anys d'edat). Les dades van ser normalitzades amb l'expressió de HPRT. L'expressió relativa de cada gen analitzat va ser expressat com INS/HPRT, PPY/HPRT i PNLIP/HPRT. Els gràfics representen la mitjana dels tres experiments realitzats. Les anàlisis van confirmar diferències estadísticament significatives (T-student= * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$).

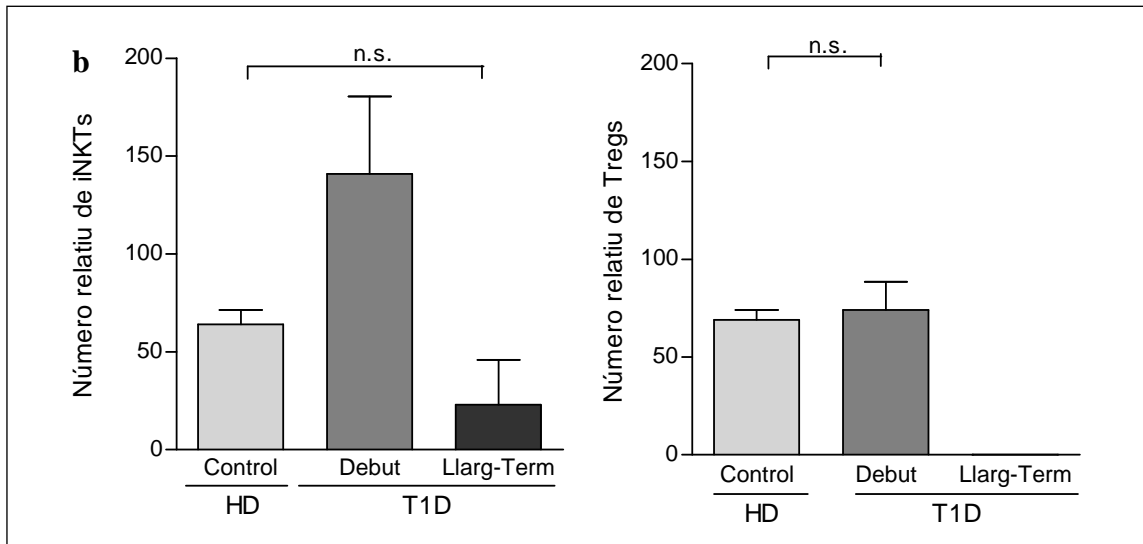


Figura 9. Anàlisi de la freqüència de cèl·lules iNKT i Tregs al pàncrees a diferents etapes del desenvolupament de la T1D. a) Quantificació de les cèl·lules iNKT basada en l'expressió relativa de la cadena α del TCR invariant (TCR V α 2J α 18). b) Detecció de cèl·lules Tregs basada en l'expressió relativa del factor de transcripció Foxp3. Totes les dades es van normalitzar utilitzant el ràtio CD3 γ /GAPDH. Els experiments van ser realitzats per PCR convencional en mostres de teixit pancreàtic de mostres de pacients al debut (nPOD#6113, 1 setmana d'evolució) i T1D de llarga d'evolució (nPOD#6046, 8 anys d'evolució), així com també a una mostra control (nPOD#6098, 17 anys d'edat). Les dades mostren la mitjana de tres experiments realitzats. Les dades no van ser estadísticament significatives.

C3. 4. Dinàmica de la infiltració de cèl·lules iNKT i Tregs durant el desenvolupament de la T1D a ratolins NOD

L'anàlisi de la distribució i freqüència de cèl·lules iNKT i Treg a les mostres de pàncrees humà (Fig. 2, 3, 5 i 9) suggerien un dinamisme dels infiltrats de cèl·lules reguladores durant les diferents etapes del desenvolupament de la T1D. L'observació que al debut de la T1D, les cèl·lules iNKTs es concentraven principalment fóra dels illots pancreàtics, mentre que les cèl·lules Tregs estaven preferentment associades a aquests, van fer hipotetitzar, que aquesta distribució diferencial podria estar associada a la progressió de la malaltia durant les diferents etapes. Per poder contestar a aquesta pregunta, es va estudiar la localització de les dues poblacions cel·lulars a diferents etapes del desenvolupament de la malaltia. La dificultat en l'accés a un nombre suficient de mostres així com el limitat grau d'infiltració de les mostres de pàncrees humà comparat amb el del ratolí, van portar a realitzar aquesta part de l'estudi en mostres pancreàtiques procedents del model de ratolí NOD. Així, es va estudiar la distribució *in situ* de les cèl·lules iNKT i Treg a ratolins NOD en diferents estadis del

desenvolupament de la T1D; a l'estat de pre-diabètic (9 setmanes); al debut de la malaltia (14 setmanes) i a ratolins NOD diabètics (20 setmanes). L'estudi per immunofluorescència de seccions de teixit pancreàtic d'aquests ratolins, va mostrar una gran diversitat en el grau d'infiltració dels illots (Fig. 10), on es van poder observar illots intactes sense cap tipus o amb mínima infiltració (Fig. 10a), illots amb una lleugera/moderada infiltració (Fig. 10b), d'altres amb una massiva i gran infiltració (Fig. 10c) i fins i tot, illots on només quedaven restes d'insulina o mínima quantitat de cèl·lules positives per la insulina (Fig. 10d). A més a més, a les mostres de ratolins NOD pre-diabètics, debut i diabètics, es van trobar nuclis d'infiltració no associats a cèl·lules positives per la insulina. Aquests nuclis d'infiltració els vam considerar com nuclis d'infiltració no associats a illots, els quals estaven distribuïts entre les cèl·lules de l'exocrí del pàncrees (Fig. 11). La importància dels nuclis d'infiltració no associats a illots és de gran interès per a l'estudi de la localització de les cèl·lules iNKT i/o Treg infiltrants al pàncrees. Que unes o les altres estiguin localitzades a la perifèria, dins i/o fóra dels illots pancreàtics o als nuclis d'infiltració no associats a illots durant les diferents etapes del desenvolupament de la T1D ens pots ajudar a entendre millor la funció de cada tipus cel·lular dins el pàncrees durant la resposta autoimmunitària. Per aquest motiu, a part d'estudiar la localització d'aquestes cèl·lules als illots pancreàtics, també es van estudiar les cèl·lules iNKT i Tregs que podrien estar associades als diferents nuclis d'infiltració no associats a illots a cada una de les etapes del desenvolupament de la T1D. Així als nuclis d'infiltració a pre-diabètics (Fig. 11a), la freqüència de cèl·lules Treg va ser més alta que la de cèl·lules iNKT, al debut (Fig. 11b), la freqüència de cèl·lules iNKT va augmentar, mentre que la de les cèl·lules Tregs va disminuir i a ratolins diabètics (Fig. 11c) la freqüència de cèl·lules iNKT continuava sent elevada en comparació amb la de les cèl·lules Treg. Quan es va estudiar el patró de tinció de cada tipus cel·lular, es va observar que era similar que al d'humans. La tinció de les cèl·lules iNKT que en aquest cas van ser cèl·lules dobles positives per $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{NK1.1}^+$ va ser una tinció superficial i la tinció del factor de transcripció Foxp3 per a la detecció de les cèl·lules Treg va ser una tinció nuclear (Fig. 11d).

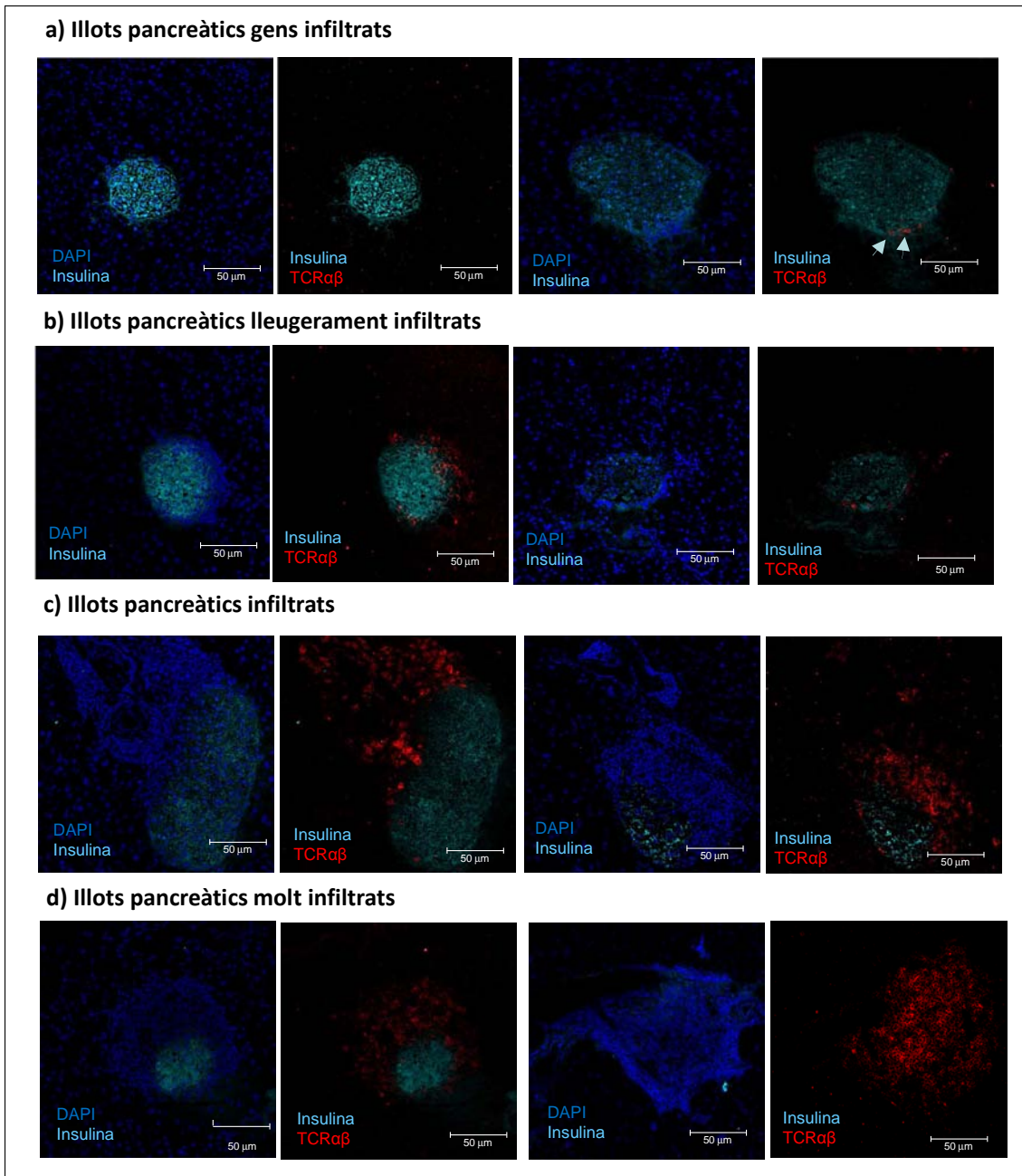


Figura 10. Diferent grau d'infiltració trobats als illots pancreàtics durant el desenvolupament de la T1D. Les imatges mostren illots pancreàtics amb (a) poca o gens infiltració; (b) lleugerament/moderadament infiltrats; (c) infiltrats; (c) molt infiltrats, on en alguns dels casos fins i tot no es detecta tinció positiva per la insulina.

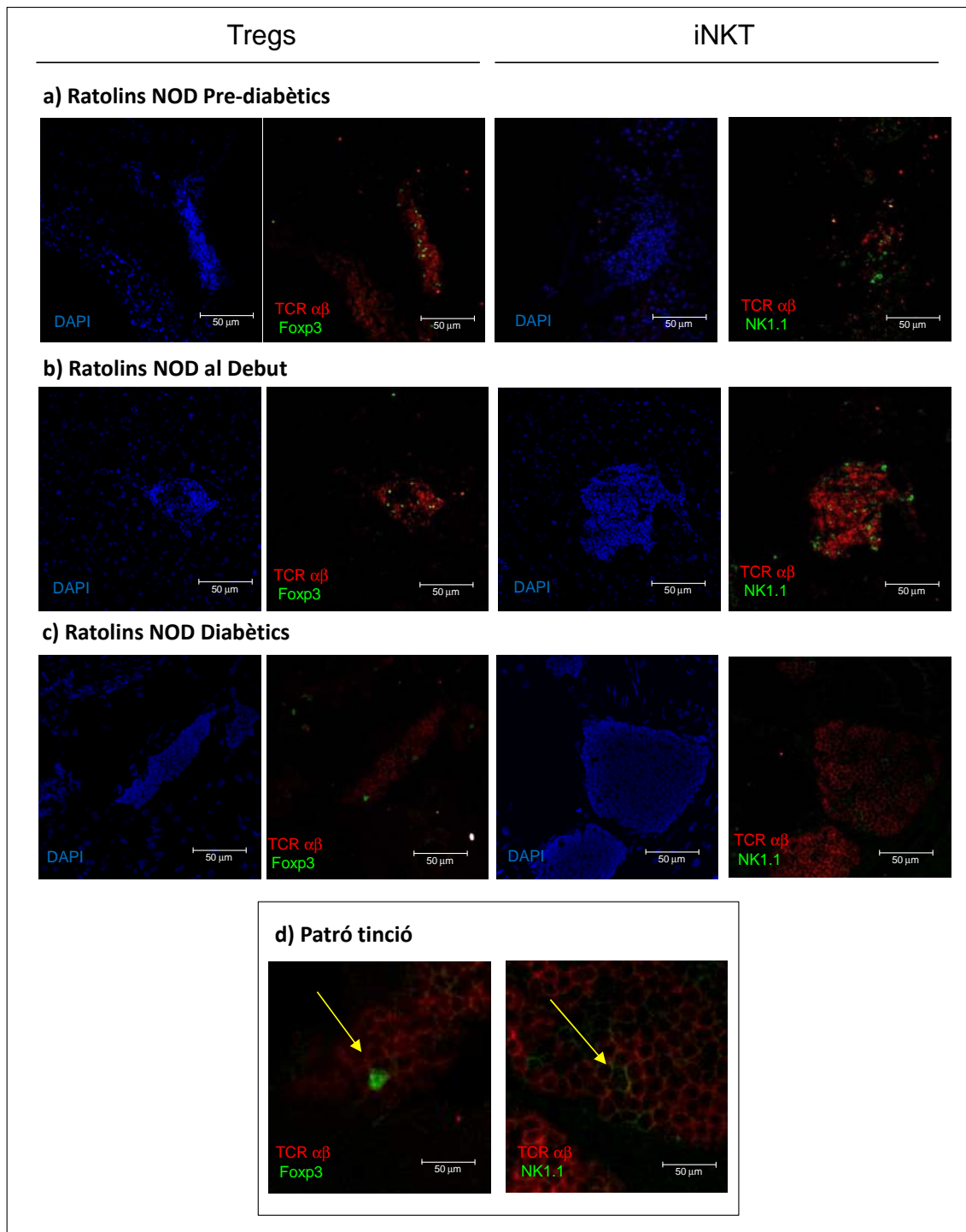
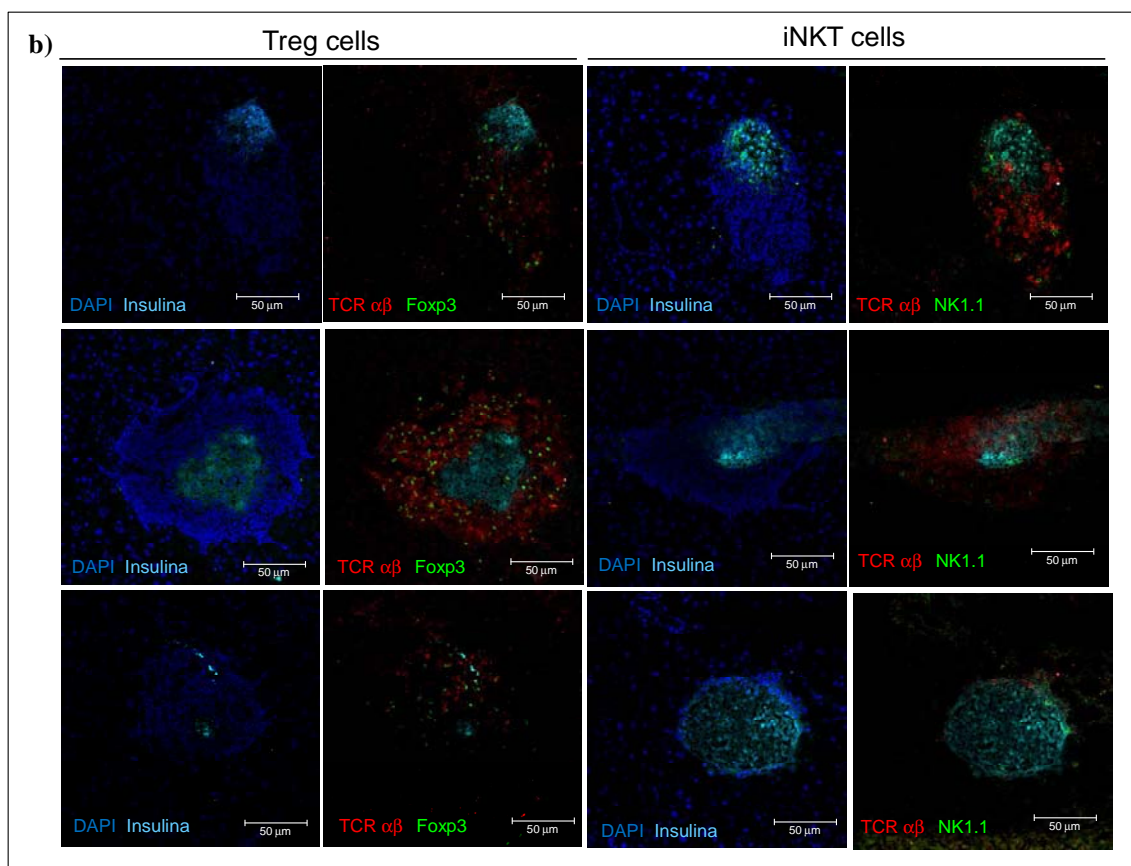
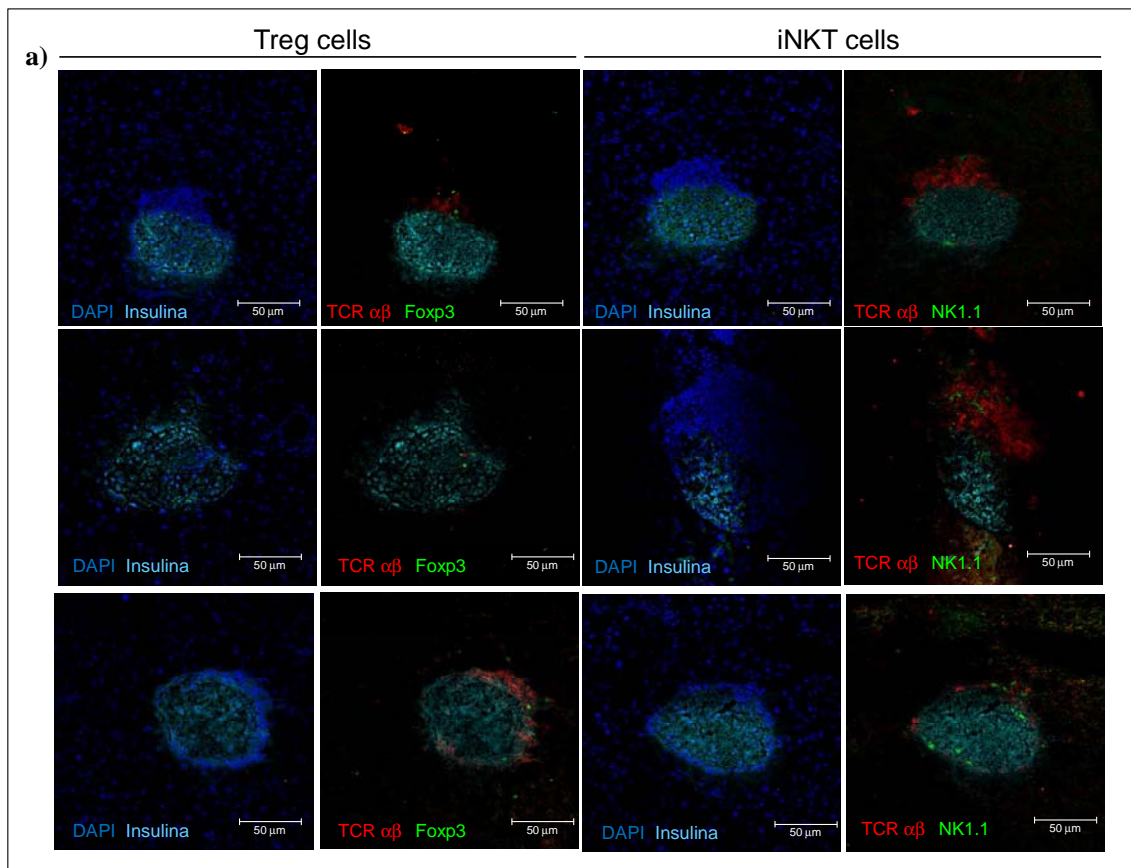


Figura 11. Nuclis d'infiltració no associats a illots pancreàtics en les diferents fases del desenvolupament de la T1D a ratolins NOD. En tots els casos s'analitzen les cèl·lules Treg i cèl·lules iNKT en els nuclis d'infiltració a; (a) Ratolins NOD pre-diabètics, (b) Debut i (c) diabètics. d) Patró de tinció de les cèl·lules Treg (dreta) i les cèl·lules iNKT (esquerra).

Les anàlisis d'immunofluorescència als illots pancreàtics de ratolins NOD pre-diabètic, es van observar molts illots pancreàtics que estaven intactes amb només un baix grau d'infiltració de cèl·lules T localitzades al voltant dels illots, produïnt peri-insulitis, on hi havia entre altres, cèl·lules iNKT ($\text{NK1.1}^+ \text{TCR}\alpha\beta^+$) i cèl·lules Treg ($\text{Foxp3}^+ \text{TCR}\alpha\beta^+$). En aquesta etapa, els nivells d'infiltració o el grau d'infiltració als illots pancreàtics per cèl·lules T era baix, però les poques cèl·lules trobades, així com les cèl·lules Treg, estaven localitzades dins i al voltant dels illots pancreàtics igual que les cèl·lules iNKT (Fig. 12a).

Pel que fa a les mostres de ratolins NOD al debut de la malaltia (14 setmanes), molts dels illots estaven afectats per peri-insulitis i fins i tot, molts d'ells mostraven insulitis. A més, es va observar un increment de cèl·lules als nuclis d'infiltració no associats a illots. Així, com al debut de la malaltia a humans, a ratolins NOD al debut, es va observar que les cèl·lules Treg estaven concentrades majoritàriament dins dels illots pancreàtics i al seu voltant i les cèl·lules iNKT eren més freqüents fóra dels illots (Fig. 12b).

Finalment, a les mostres de ratolins NOD diabètics (20 setmanes), el nombre de cèl·lules positives per insulina era molt baix. A més, la majoria dels illots pancreàtics presentaven insulitis. Els illots on encara es podia detectar mínimament l'expressió d'insulina, presentaven un alt grau de peri-insulitis amb una massiva infiltració de cèl·lules T i un augment de cèl·lules als nuclis d'infiltració no associats a illots. En aquesta etapa, les cèl·lules Treg i les iNKTs mostraven el mateix patró de distribució com a l'etapa del debut de la malaltia, tot i que amb diferències quantitatives, ja que en aquest cas el número de cèl·lules infiltrants estava incrementat respecte al debut (Fig. 12c).



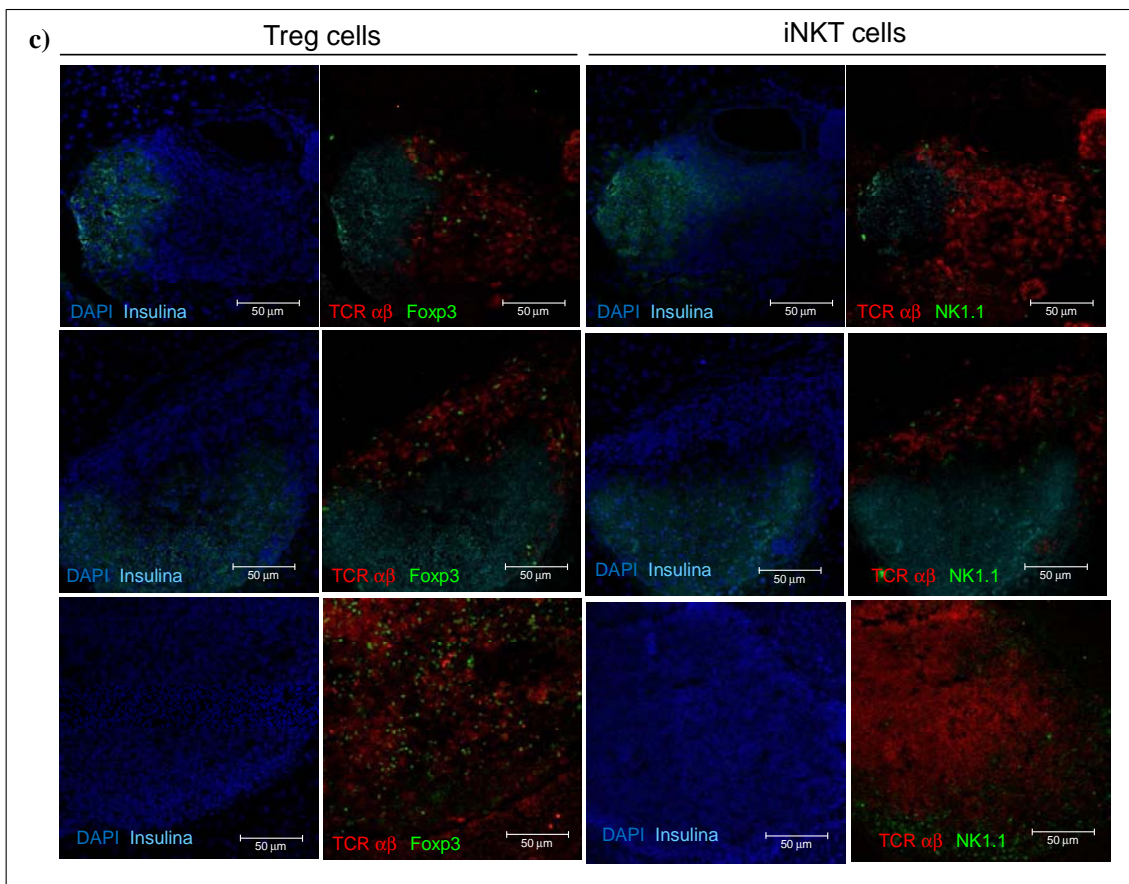


Figura 12. Localització de cèl·lules iNKT i Tregs al pàncrees de ratolins NOD en diferents etapes del desenvolupament de la T1D. Anàlisi d'immunofluorescència usant anticossos monoclonals específics, sobre seccions de teixit: a) pre-T1D (9 setmanes), b) debut (14 setmanes), c) Diabètic (20 setmanes). Les imatges mostren la distribució de les cèl·lules iNKT ($\text{TCR}\alpha\beta^+\text{NK1.1}^+\text{DAPI}$) i de les Tregs ($\text{TCR}\alpha\beta^+\text{Foxp3}^+\text{DAPI}$). La figura mostra tres exemples de cada una de les etapes de la T1D.

Per poder interpretar més acuradament les dades d'immunofluorescència, es van quantificar les cèl·lules positives d'aquestes imatges. Es van quantificar un total de 20 illots i 6 nuclis d'infiltració de dos ratolins NOD en cada una de les etapes de la malaltia (Pre- T1D, Debut i Diabètic). Els resultats van confirmar, que la freqüència i distribució de les cèl·lules iNKT canviava durant la progressió de la T1D (Fig. 13a). Així, a ratolins NOD pre-diabètics, el número de cèl·lules iNKT va ser similar als illots pancreàtics i als nuclis d'infiltració no associats a illots. Aquesta distribució canviava significativament al debut de la malaltia, on augmentava la presència de cèl·lules iNKT als nuclis d'infiltració no associats a illots mentre disminuïa als illots pancreàtics. Aquesta diferència es va mantenir a ratolins NOD diabètics on s'observava un augment general de la freqüència de cèl·lules iNKT. L'augment global de la freqüència de cèl·lules iNKT des de prediabètic a ratolins NOD diabètics eren estadísticament significatives (T-student on * $p=0,050$). També es va poder constatar que la freqüència de cèl·lules

Treg a les mostres de pàncrees era més alta que la de cèl·lules iNKT (Fig. 13 b). En aquest cas, a ratolins NOD pre-diabètics la freqüència de cèl·lules Tregs era similar a illots i nuclis d'infiltració, tal i com s'havia observat en el cas de les cèl·lules iNKT. En contrast amb els resultats de les cèl·lules iNKT, la freqüència de cèl·lules Treg va incrementar als illots pancreàtics però es va mantenir estable als nuclis d'infiltració durant el progrés de la T1D. Aquest increment als illots pancreàtics no va ser estadísticament significatiu però va demostrar la tendència de les cèl·lules Tregs a mantenir un patró de distribució oposat al de les cèl·lules iNKT.

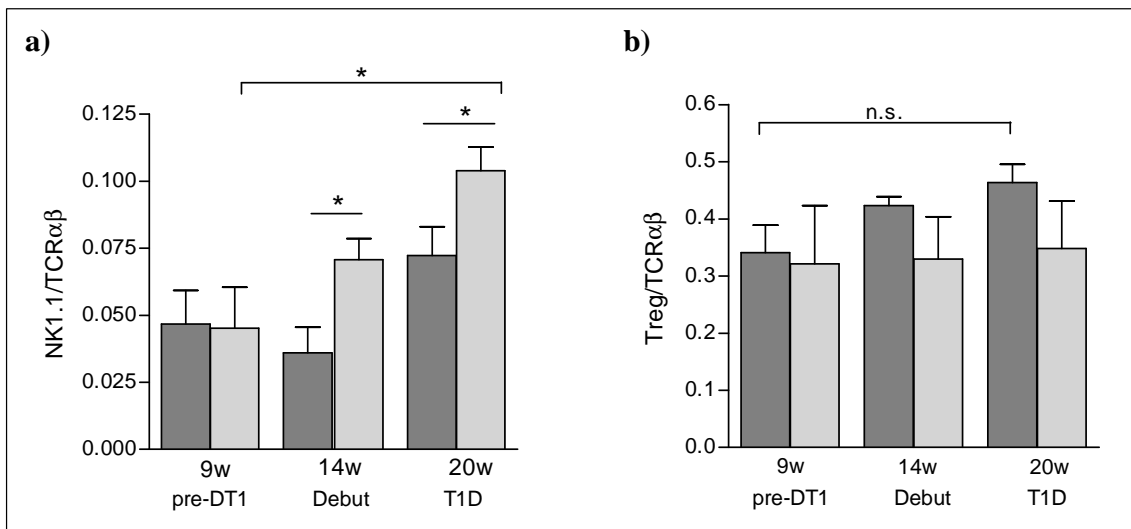


Figura 13. Quantificació de la immunofluorescència. Es va quantificar el número de cèl·lules iNKT (a) i el número de cèl·lules Treg (b) tant als illots pancreàtics (n=10) com als nuclis d'infiltració no associats a illots (n=6). Les anàlisis estadístics usant una T-student van donar resultats estadísticament significatius en la freqüència de cèl·lules iNKT entre illots i nuclis d'infiltració, durant les diferents etapes del desenvolupament de la T1D (* p=0,050).

Per tant, aquestes dades suggerien una expansió de cèl·lules iNKT i Treg al pàncrees paral·lel al progrés de la diabetis. L'expansió de cèl·lules Treg era evident a l'interior i al voltant dels illots pancreàtics en comparació a la població estable localitzada a l'exocrí (nuclis d'infiltració). Al mateix temps, hi havia una expansió important de cèl·lules iNKT als nuclis d'infiltració no associats a illots teixit exocrí i que era menor a l'interior i al voltant dels illots pancreàtics.

Prenent l'escenari d'inici o del debut de la malaltia, que és l'únic que podem comparar amb les dades de distribució obtingudes a pàncrees humana, podem concloure que el patró invers de distribució d'aquests dos tipus de cèl·lules reguladores descrit en els ratolins NOD (Fig. 13) coincideix amb el descrit en el pàncrees humana al debut de la malaltia (Fig. 1). Per tant, les dades obtingudes de ratolins NOD van confirmar el patró descrit al pàncrees humana, indicant que tot i que ambdues poblacions es troben als

illots pancreàtics, les cèl·lules iNKT es concentren majoritàriament als nuclis d'infiltració no associats a illots, mentre que les cèl·lules Tregs ho fan dins o al voltant dels illots pancreàtics. Per tant, la comunicació entre aquests dos tipus de cèl·lules T reguladores podria ser important en el control del desenvolupament de la T1D.

Discussió Capítol 3

La majoria de processos relacionats amb el desenvolupament de la T1D han estat ben documentats en models animals, però actualment encara hi ha poques dades sobre el desenvolupament de la T1D a humans. La raó de que hi hagi poca informació al respecte, és degut principalment a la poca disponibilitat de mostres pancreàtiques de controls i pacients. Per això, l'anàlisi del pàncrees d'un pacient amb T1D és una possibilitat única d'estudiar els determinants de la progressió de la malaltia i més quan aquesta mostra prové d'un pacient 5 dies després del diagnòstic clínic de la T1D (Cas 1). A més, s'ha pogut fer una comparació amb teixit procedent de pacients de curta i llarga evolució obtinguts a partir del Network for Pancreatic Organ Donors with Diabetes de la Juvenile Diabetes Research Foundation .

La infiltració de cèl·lules T autoreactives als illots pancreàtics és distintiu de la T1D [48, 142] Aquestes cèl·lules, tant cèl·lules T CD8⁺ com sobretot T CD4⁺, es consideren responsables de la destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques productores d'insulina. Per mantenir l'homeòstasi del teixit, la seva funció és controlada per diferents poblacions de cèl·lules reguladores i mediadors cel·lulars d'immunomodulació. Aquest delicat equilibri pot ser alterat per defectes en algun d'aquests mecanismes *in situ*. En els capítols anteriors s'ha descrit l'estudi del paper de les cèl·lules iNKT i Tregs en el control de l'autoreactivitat, però a nivell de limfòcits de sang perifèrica de pacients amb T1D al debut clínic de la malaltia. Si aquestes cèl·lules reguladores han de controlar l'autoreactivitat a l'òrgan diana de la resposta, llavors han de ser funcionals *in situ*. Per tant, aquest treball s'ha centrat en l'anàlisi de la funció de les cèl·lules iNKT i Tregs a l'òrgan diana de la resposta autoimmunitària.

Els resultats obtinguts en aquest estudi, han demostrat la presència d'ambdós tipus cel·lulars al pàncrees i el que és més interessant encara, no només en el pàncrees dels pacients amb T1D sinó també als pàncrees de les mostres dels controls sans. De fet, l'estudi ha demostrat la presència de cèl·lules T al pàncrees tant de pacients amb T1D com de controls. Aquesta infiltració de limfòcits a pàncrees de controls s'havia suggerit anteriorment que podia ser deguda a una pancreatitis resultant del procés d'extracció de l'òrgan. De tota manera, estudis més recents, han descrit la presència de cèl·lules T residents al teixit. En alguns casos d'infecció vírica, s'ha proposat que processos inflamatoris locals, ja era suficient per poder atreure cèl·lules T al teixit, on aquestes podien acabar sent cèl·lules T memòria residents de teixit i persistir indefinidament [142,219,220]. Aquestes cèl·lules T podrien també podrien ser cèl·lules iNKT o cèl·lules Treg, les quals podrien estar implicades a la regulació de la homeòstasi del pàncrees.

De fet, tant les cèl·lules Treg com les cèl·lules iNKT, com hem vist als capítols anteriors, poden contribuir al manteniment de la homeòstasi dels teixits, a través de la seva funció reguladora [221,222]. Així, en condicions patològiques com ara la T1D, s'espera que totes dues poblacions cel·lulars puguin participar en la regulació de la resposta autoreactiva. Els nostres resultats van mostrar que la freqüència a sang perifèrica de cèl·lules iNKT a controls i pacients amb T1D al debut era similar. Contràriament als nostres resultats, estudis previs, van demostrar una elevada freqüència de cèl·lules iNKT a pacients amb T1D al debut [223], dades conflictives i contradictòries amb resultats previs on van descriure una baixa freqüència de cèl·lules iNKT a PBMCs de pacients amb T1D [95,224]. Estudis més recents, van publicar un significat baix percentatge en nombres absoluts de cèl·lules iNKT a pacients amb T1D comparat amb controls [225]. Diferents autors suggerien que les discrepàncies observades en els diferents estudis, respecte la freqüència de cèl·lules iNKT a sang perifèrica d'individus sans i pacients amb T1D, possiblement era deguda a una diferència en l'edat del debut de la T1D en cada un dels pacients, així com la durada de la malaltia.

Pel que respecta a la freqüència de cèl·lules Treg, els nostres resultats no van mostrar diferències en freqüència a sang perifèrica entre individus sans i pacients amb T1D al debut de la malaltia. Tot i així, diversos estudis han relacionat les cèl·lules Treg amb autoimmunitat, on s'ha suggerit alteracions a nivell de freqüència i funció de les cèl·lules Treg de PBMCs de pacients amb malalties autoimmunitàries [226,227]. Diversos treballs en relació amb la T1D han trobat resultats no concloents que van des de la reducció de la freqüència i funció de cèl·lules Treg a d'altres on no s'han trobat diferències comparant el número de cèl·lules Treg de pacients i controls a sang perifèrica [117,199,228,].

Quan es va analitzar la presència de cèl·lules iNKT i Tregs a pàncrees del pacient al debut clínic de la malaltia al teixit total (TT) (Cas 1), es va observar que les cèl·lules iNKT i Treg eren presents tant al pàncrees del pacient amb T1D com a la mostra de pàncrees de l'individu control, tot i que la freqüència d'aquestes va ser més elevada al pàncrees del pacient amb T1D. Tot i així, al TT va ser molt més elevada la freqüència de cèl·lules iNKT comparada amb la de les Tregs. Aquestes dades es va confirmar en experiments de PCR convencional on es va analitzar la distribució d'ambdues poblacions cel·lulars en diferents etapes del desenvolupament de la T1D i on es va observar que al debut de la malaltia al TT la freqüència de cèl·lules iNKT era més elevada que la de Tregs.

L'estudi de cèl·lules Treg, va mostrar, que al debut de la malaltia es produïa un increment significatiu de la proporció de cèl·lules Foxp3⁺ als illots pancreàtics dels pacients amb T1D al debut (Cas 1). Aquest augment era més evident quan es comparava amb els valors obtinguts a les mostres de TT de pàncrees (Cas PanH#6113, 1 setmana d'evolució, nPOD, JDRF) on la diferència entre control i T1D al debut era mínima, indicant que l'augment en el nombre de cèl·lules Foxp3⁺ es donava en els illots pancreàtics. L'anàlisi per immunofluorescència de seccions de pàncrees d'aquestes mateixes mostres, no fou massa clarificador, primer perquè es detectaven nombres molt baixos de cèl·lules infiltrants, però a més a més, era molt difícil veure cèl·lules Foxp3⁺. Aquests resultats contrastaven amb els descrits en un estudi previ on es caracteritzava la composició de l'infiltrat cel·lular a pàncrees de pacients amb T1D al debut de la malaltia mitjançant estudis d'immunohistoquímica [1]. Aquest estudi va demostrar la presència de cèl·lules Foxp3⁺ al pàncrees d'un pacient amb T1D, el qual havia mort pocs mesos després del debut de la malaltia, tot i que en un nombre mínim.

Donat que les cèl·lules Tef activades poden expressar nivells alts de CD25 i Foxp3 i la seva especificitat antigènica és similar a la de les cèl·lules Treg, ja que ambdues estan restringides per molècules de MHC II, es va voler estudiar si els nivells de cèl·lules Treg detectades al pàncrees del Cas 1, podrien correspondre a un fenotip de cèl·lules Treg. Ja que no s'ha pogut estudiar la metil·lació del promotor de factor de transcripció Foxp3 que és el que determina la classificació definitiva de les cèl·lules Treg, el que s'ha fet és aïllar aquestes cèl·lules amb fenotip regulador a partir de TT del pàncrees del Cas 1 i comprovar que eren realment cèl·lules amb funció reguladora a partir d'assajos de supressió *in vitro* usant diferents ràtios Treg:Tef. Els resultats van mostrar, que les cèl·lules aïllades eren cèl·lules reguladores ja que suprimien PBMCs al·logènics i també un clon de cèl·lules Tef autòleg. Per tant, tot i que les dades d'immunofluorescència obtingudes a seccions pancreàtiques humanes també han mostrat un baix número de cèl·lules Treg a pacients al debut de la T1D, les dades de qPCR obtingudes i l'aïllament de clons de cèl·lules amb fenotip CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ amb capacitat supressora, demostraven clarament, la presència de cèl·lules Treg a nivell pancreàtic durant el debut de la malaltia.

Les cèl·lules iNKT, caracteritzades a nivell fenotípic per la seva expressió del TCR invariant V α 24J α 18, també es van observar al pàncrees de pacients amb T1D al debut (cas 1). De fet, un estudi previ on es va analitzar el repertori del TCR de les cèl·lules T infiltrants al pàncrees del Cas 1 [229] havia indicat que hi havia una expansió clonal de cèl·lules amb una cadena V β 11 del TCR a la fracció d'illots pancreàtics purificats. A més, tot i que menys abundant, també s'havia mostrat una expansió clonal de cèl·lules

amb la cadena V α 24 del TCR (E.Scholz et al. *Treball de Recerca, Màster d'Immunologia Avançada 2008/2009*). Aquest resultat suggereix, que la població de cèl·lules amb un TCR V β 11⁺ expandida dins dels illots pancreàtics del pacient amb T1D podrien pertànyer a cèl·lules iNKT. Per confirmar els nostres resultats obtinguts per qPCR i veure que realment es tractava de cèl·lules iNKT, es van aïllar cèl·lules amb el TCR invariant a partir dels limfòcits intrapancreàtics (IPLs) del Cas 1 i es va comprovar que aquestes cèl·lules eren cèl·lules iNKTs amb l'anàlisi per citometria de flux del marcatge amb tetràmers de CD1d carregats amb α GalCer. Estudis recents, han analitzat la localització anatòmica de diferents subpoblacions de cèl·lules iNKT al timus de ratolí usant tetràmers de CD1d carregats amb α GalCer conjugats amb fluorocroms per tenir seccions de teixit [230]. Aquesta, és una aproximació molt interessant perquè permet identificar cèl·lules amb aquesta especificitat antigènica i no dependre només de la presència d'un TCR determinat. No obstant això, a causa de l'escassetat de material humà fresc, no s'ha pogut posar a punt aquesta tècnica que sens dubte, hauria estat la confirmació més clara de la seva capacitat funcional *in situ*. En qualsevol cas, una part essencial de la caracterització de les cèl·lules iNKT pancreàtiques seria conèixer la seva especificitat antigènica. L' α GalCer no pot ser la diana antigènica de les cèl·lules iNKT autoreactives perquè aquest és un antigen lipídic obtingut a partir d'un extracte de l'alga marina "*Agelas mauritanus*" descobert al 1997 durant estudis en ratolins intentant buscar mecanismes de resposta antitumoral [231]. Inicialment, es pensava que l'origen d'aquest glicoesfingolípid era l'esponja mateixa, però estudis posteriors han suggerit que realment l' α GalCer provenia probablement d'un bacteri que colonitzava l'esponja. En tot cas, les cèl·lules iNKT que formen part dels IPLs haurien de ser específics per un antigen d'origen pancreàtic. Al laboratori s'està fent un estudi per identificar els antígens propis de les cèl·lules pancreàtiques que podrien estar reconeixent les cèl·lules iNKT. L'estudi s'ha fixat inicialment, en la família dels glicoesfingolípid perquè d'una banda és a la qual pertany l' α GalCer i de l'altre, perquè estudis recents han proposat que compostos amb configuracions alternatives (configuració beta) d'aquesta família eren reconeguts per cèl·lules iNKT humanes. Estudis recents, han descrit una gran quantitat d'antígens propis amb configuració β a humans, així com el compost β -glucosilceramida (β -GluCer) el qual produïa l'activació de les cèl·lules iNKT [62]. Diversos estudis indicaven que la β GluCer era el lípid actiu endogen que activava les cèl·lules iNKT. Contràriament, d'altres estudis realitzats, van arribar a concloure que l'activació de les cèl·lules iNKT no era directament deguda a la β GluCer, sinó que la seva digestió podia incloure α -glicolípid responsables de l'activació de les cèl·lules iNKT, ja que moltes vegades els compostos amb configuració β no van aconseguir activar les cèl·lules iNKT. Més recentment s'han identificat contaminants amb la conformació alpha a les mostres de β GluCer i per tant, van ser considerats els que realment activàvem les cèl·lules iNKT [232, 233].

Tot i així, vist que l'estrès cel·lular indueix alteracions en el metabolisme d'aquests glicoesfingolípidis a les cèl·lules β pancreàtiques i que per tant, es poden generar neoantígens reconeguts per les cèl·lules iNKT, s'ha analitzat si canvis en els nivells de glucosa, que es produeixen en pacients amb T1D, generen antígens que puguin ser reconeguts per cèl·lules iNKT al pàncrees (*Sánchez Cano et al. dades no publicades*). En aquests estudis es va sotmetre la línia de cèl·lules β HP62 a estrès cel·lular induït per canvis en els nivells de glucosa i es van extreure els glicoesfingolípidis pel seu estudi. Els estudis preliminars van indicar que les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D reconeixien els extractes de glicoesfingolípidis de cèl·lules β i que l'activació, era més gran amb extractes de cèl·lules β sotmeses a estrès cel·lular. Aquesta activació correlacionava amb un increment de la concentració de glicoesfingolípidis en aquests extractes. Aquest és un resultat molt interessant i s'està treballant per identificar quin o quins glicoesfingolípidis endògens activen les cèl·lules iNKT.

Per tant, la presència de cèl·lules iNKT al teixit pancreàtic del pacient amb T1D, així com la demostració de que les cèl·lules iNKT poden reconèixer extractes lipídics procedents d'una línia de cèl·lules β pancreàtiques i que l'activació de cèl·lules iNKT correlaciona amb un increment de la concentració de glicoesfingolípidis en aquests extractes, suggereix que possiblement, la resposta autoimmunitària durant la T1D no es doni als limfonodes, sinó que es doni a *in situ* al pàncrees. Això voldria dir, que si les cèl·lules iNKT són al pàncrees durant la resposta immunitària, han d'estar reconeixent algun tipus d'antigen lipídic, que possiblement, hagi estat generat durant el procés inflamatori i l'estrès de les cèl·lules β . El descobriment d'aquests neoantígens obriria una nova expectativa a l'estudi de diferents tipus d'immunoteràpia dirigint la resposta immunitària contra un antigen determinat.

L'anàlisi també ha demostrat que la localització d'aquests dos tipus cel·lulars al pàncrees és diferent. L'anàlisi del Cas 1 va demostrar que les cèl·lules Treg eren més abundants als illots pancreàtics, mentre que les cèl·lules iNKT es concentraven sobretot al teixit exocrí, ja que eren més abundants a les mostres pancreàtiques de TT. Aquesta distribució es trobava al pàncrees d'un pacient al debut clínic de la malaltia. El fet de trobar les cèl·lules iNKT i les Tregs al pàncrees, però amb una localització diferent l'una de l'altre, podria estar relacionat amb una funció distintiva entre ambdues poblacions cel·lulars a nivell pancreàtic durant la resposta autoimmunitària. Diversos estudis, han suggerit la presència d'alts nivells d'infiltració al compartiment exocrí del pàncrees, així com DCs, cèl·lules T CD4⁺ i T CD8⁺ [234] indicant un alt nivell d'activació al compartiment exocrí. Nikolic et al. [235] van proposar que la presència de DCs a l'exocrí era essencial per poder retenir als limfòcits a lesions pancreàtiques primerenques, fins i tot abans del debut de la T1D. Calderon et al. [236] van mostrar

que les DCs presents als illots pancreàtics mostraven alts nivells d'expressió del complex MHC, això en part, correlacionava amb els alts nivells de cèl·lules Treg observats a l'interior dels illots pancreàtics.

Per altra banda, diversos estudis [237] van descriure un augment de l'expressió de MHC I a nivell de l'exocrí, el que podria explicar en part, la gran quantitat de cèl·lules T CD8⁺ observades en aquest compartiment. Els nostres resultats van mostrar, que les cèl·lules iNKT estaven principalment localitzades fóra dels illots pancreàtics, suggerint la seva importància a nivell de l'exocrí, per poder controlar i retenir els limfòcits T autoreactius abans de que arribin al illots pancreàtics. Així, les cèl·lules iNKT controlarien la progressió de la resposta autoimmunitària contra les cèl·lules β dels illots pancreàtics.

Si les dues poblacions de cèl·lules reguladores predominaven en zones diferents del pàncrees al debut, aquesta distribució era pròpia d'un moment concret del procés i tenia per tant a veure amb la progressió de la malaltia?. Quan es va analitzar la presència d'aquestes dues poblacions a diferents etapes del desenvolupament de la malaltia (control, Debut i Diabètics de llarga evolució) es va observar que en general, la infiltració del pàncrees era lleu ja que només afectava alguns dels illots pancreàtics. Aquesta mínima infiltració era característica no només del debut de la T1D sinó també de pacients amb T1D de llarga evolució de la malaltia i correlacionava amb estudis publicats anteriorment [27,44,45,46,142,237]. Fou més sorprenent la identificació de nuclis d'infiltració no associats a illots, on les cèl·lules T s'acumulaven formant petits clústers, els quals es trobaven distribuïts per entre les cèl·lules acinars del teixit exocrí. No és estrany doncs, que a estudis d'expressió gènica, es demostrés que mentre al teixit total de pàncrees de pacients amb T1D al debut hi havia un augment en l'expressió de gens del sistema immunitari comparat amb pàncrees controls, als illots pancreàtics predominava una reducció en l'expressió de gens amb funció endocrina i neurològica sense canvis significatius en els gens del sistema immunitari. Els estudis d'expressió gènica van confirmar una disminució dels nivells de transcrits específics de cèl·lules β als illots pancreàtics com era d'esperar, però tot i així, també van mostrar una reducció dels transcrits específics de l'exocrí donant suport a la idea de que la resposta durant la diabetis no és exclusiva dels illots pancreàtics, sinó que també es produeix una certa resposta autoimmunitària al compartiment exocrí [143,238].

Els estudis també van demostrar que la freqüència i localització de cèl·lules iNKT i cèl·lules Treg al pàncrees durant el progrés de la T1D era molt dinàmic, ja que ambdues poblacions cel·lulars canviaven en número i distribució a mesura que avançava la malaltia. Aquest dinamisme, suggeria un paper específic d'aquestes cèl·lules al pàncrees durant la progressió de la T1D, on les cèl·lules iNKT localitzades preferentment fóra dels illots pancreàtics estarien regulant la resposta

autoimmunitària a nivell de l'exocrí on estarien reconeixent algun neoantígen, generat en etapes prèvies durant la inflamació del pàncrees, evitant d'aquesta manera, la migració de cèl·lules Tef autoreactives als illots pancreàtics o fins i tot, podrien estar regulant la pròpia resposta immune contra components de l'exocrí. Per altra banda, les cèl·lules Treg que eren principalment localitzades a l'interior dels illots pancreàtic, estarien controlant la resposta autoimmunitària contra la destrucció dels illots pancreàtics a partir de la secreció de citocines i d'altres mecanismes de supressió de la proliferació cel·lular.

Degut als baixos nivells d'infiltració al pàncrees humà, fins i tot en condicions patològiques, es van corroborar els resultats obtinguts amb l'anàlisi de pàncrees de ratolins NOD d'edats diferents i per tant representatives de diferents estadis del desenvolupament de la T1D. En aquest model de diabetis espontània, on els nivells d'infiltració són molt més elevats, es van confirmar les dades obtingudes a la diabetis humana [35]. Es va corroborar que al debut de la T1D, les cèl·lules iNKT estaven concentrades fóra dels illots pancreàtics, distribució similar a l'observada en pàncrees humà durant la mateixa etapa. Amb la progressió de la malaltia als ratolins NOD continuava l'expansió de la població de cèl·lules iNKT sobretot al teixit exocrí. Aquesta dada contrastava amb l'obtinguda en el pàncrees de pacient amb T1D de llarga evolució (8 anys) on les cèl·lules iNKT eren gairebé indetectables. És difícil comparar el curs clínic de la malaltia entre humans i ratolins NOD, però és possible que la T1D humana estigui molt més avançada 8 anys després del diagnòstic que no a ratolins NOD diabètics de 20 setmanes. Les cèl·lules Treg, en canvi, semblaven seguir un curs diferent al que s'havia vist al pàncrees humà. Al pàncrees de ratolins NOD al debut es concentraven preferentment dins dels illots pancreàtics o al seu voltant, com si la seva funció principal estigués relacionada amb la regulació *in situ* del dany a les cèl·lules β . A més, la freqüència d'aquestes cèl·lules seguia augmentant a ratolins NOD diabètics (20 setmanes) mentre que es trobaven en baix nombre a les mostres del pacient amb T1D de llarga evolució. Aquesta baixa freqüència correlacionava amb una clara disminució de la massa de cèl·lules β que es podia deduir per la reducció dràstica de l'expressió d'insulina en aquesta mostra pancreàtiques. Aquestes dades suggerien doncs, que en el cas d'humans després de 8 anys d'evolució de la T1D s'havia perdut tota la capacitat de regulació *in situ* i es podia especular que degut a la desaparició d'autoantigen al pàncrees, desapareixien també les cèl·lules encarregades de regular la resposta T efectora autoreactiva.

Tot i així, dades d'expressió gènica van demostrar que encara es detectava transcrits específics d'illots pancreàtics a pacients amb T1D de 8-10 d'evolució, suggerint que la destrucció de les cèl·lules β durant el desenvolupament de la T1D és un procés en curs molt lent [143].

Aquest estudi també confirmava la presència de nuclis d'infiltració distribuïts entre les cèl·lules acinars del teixit exocrí, que s'havien observat a les mostres de pàncrees humà. Aquests nuclis contenien cèl·lules Treg però sobretot cèl·lules iNKTs. Una possible explicació de l'existència d'aquests nuclis, podria ser que es tractés de zones del teixit, on prèviament hi havia cèl·lules β productores d'insulina que havien estat destruïdes per les cèl·lules Tef autoreactives. D'aquesta manera s'explicaria la presència d'aquestes cèl·lules reguladores a mostres de pacients amb T1D de llarga evolució i a ratolins NOD diabètics, on la majoria dels illots pancreàtics estan destruïts. Però també es van trobar nuclis d'infiltració a mostres de pàncrees de controls sans, debut i de ratolins NOD pre-diabètics, on la majoria dels illots pancreàtics encara eren intactes i per tant, mantenien la seva estructura funcional. En aquest cas, es podria tractar de grups de cèl·lules que es dirigirien cap als illots pancreàtics, ja que en molts dels casos aquests nuclis d'infiltració estaven connectats a ductes [239,240]. Alternativament, aquestes cèl·lules podrien estar regulant i controlant la inflamació al teixit exocrí. Diferents estudis van descriure que la fins ara inapreciada presència de cèl·lules T CD8⁺ al compartiment exocrí podria significar la seva implicació amb l'inici i la propagació de la T1D [241]. Aquests estudis, també suggerien que aquestes cèl·lules T, podrien romandre al pàncrees exocrí després de la pèrdua total de les cèl·lules β productores d'insulina, com a cèl·lules T memòria residents. D'altres estudis, van mostrar alts nivells d'infiltració a pàncrees exocrí de pacients amb T1D comparats amb individus controls [244]. Fins i tot, es va descriure una alta freqüència de DCs a l'exocrí de pacients amb T1D. Aquestes dades suggerien una potencial presentació antigènica i activació de cèl·lules T durant l'inici de la malaltia a nivell de l'exocrí. Con s'ha esmentat anteriorment la freqüència de cèl·lules iNKT era més elevada a l'exocrí que a l'interior dels illots pancreàtics, per tant, es podria pensar que les DCs estan presentant neoantígens a les cèl·lules iNKT a nivell de l'exocrí, intentant d'alguna forma controlar la resposta autoimmunitària contra el pàncrees a l'inici de la malaltia. Aquests estudis, van mostrar una correlació entre la freqüència de DCs i la presència de cèl·lules T CD4⁺ al pàncrees exocrí, així com una major freqüència de cèl·lules CD4⁺ a pàncrees exocrí de pacients amb T1D que al d'individus control [245]. Per tant, la presència de cèl·lules iNKT a l'exocrí podria contribuir a la regulació de les cèl·lules T autoreactives infiltrants, les qual contribueixen i perpetuen la destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques als pacients amb T1D.

Per tant, veien aquest resultat i veien els resultats obtinguts al [capítol 1](#) on les cèl·lules iNKT de PBMCs de pacients amb T1D no tenien capacitat supressora de la proliferació de les cèl·lules Tef, és molt important i imprescindible analitzar si les cèl·lules iNKT aïllades dels IPLs, les quals són reconegudes pel tetràmer carregats amb α GalCer, tenen capacitat reguladora o efectora. El fenotip de les cèl·lules aïllades de IPLs, va ser preferentment iNKT-CD4⁺, el qual està associat a un fenotip regulador [244] així, possiblement, aquestes cèl·lules no tinguin una funció efectora a nivell pancreàtic durant la resposta autoimmunitària a la T1D sinó una funció reguladora de la inflamació, la qual s'estaria donant a nivell de l'exocrí, on les DCs podrien estar presentant diversos neoantígens, controlant d'alguna manera l'onada d'infiltració cel·lular produïda durant la T1D. En qualsevol cas, és possible que l'entorn inflamatori del pàncrees moduli la funcionalitat de les cèl·lules reguladores.

Així, ja que les dades presentades al [capítol 2](#) han mostrat la capacitat de les cèl·lules iNKT de contribuir positivament a la capacitat reguladora de les cèl·lules Treg a donants sans, és possible, que hi hagi una certa comunicació entre aquest dos grups de cèl·lules T reguladores que podrien afavorir el control de la malaltia, ja que totes dues són presents *in situ* a l'òrgan diana de la resposta autoimmunitària. Aquesta interacció, podria afavorir el disseny de noves formes d'immunoteràpia usant la combinació conjunta de cèl·lules Treg i iNKTs, amb la finalitat d'augmentar la funció supressora i d'aquesta manera reprimir la destrucció de les cèl·lules β pancreàtiques, disminuint la incidència de la T1D.

Discussió General



Els processos moleculars pels quals el sistema immunitari acaba destruint les cèl·lules β pancreàtiques productores d'insulina encara no estan del tot clars. A totes les malalties autoimmunitàries, la resposta contra antígens propis comença molt abans del debut clínic de la malaltia. L'accés al teixit pancreàtic patològic a la T1D, és complicat perquè l'alt contingut d'enzims digestius el fa propens a una ràpida autòlisi. Per tant, aconseguir biòpsies pancreàtiques suposa un alt risc de patir pancreatitis i no es fan de forma habitual. La falta de material humà ha fet que molts dels estudis s'hagin fet en models animals, en el cas de la T1D, el model escollit principalment és el model de ratolí NOD que desenvolupa espontàniament la diabetis.

Les estratègies d'immunoteràpia usant iNKT dissenyades fins ara, tenen com a objectiu restaurar la seva freqüència. Un dels mètodes usats per intentar augmentar-ne la freqüència va ser injectar DCs carregades amb α GalCer. Aquesta estratègia va augmentar la freqüència de cèl·lules iNKT així com la seva secreció de citocines. Aquest mètode també ha mostrat efectes beneficiosos en la protecció contra el càncer, així com la injecció directa de l' α GalCer mostrant limitacions relacionades amb la via d'administració del glicoesfingolípid [245,246,247].

Les dades presentades en aquesta tesi doctoral demostren que les cèl·lules iNKT d'individus sans tenen capacitat supressora que depèn bàsicament de la secreció d'IL-13. Les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D perden aquesta capacitat reguladora alhora que disminueix la secreció d'IL-13.

La secreció de citocines per les cèl·lules iNKT ve determinada entre d'altres factors, per l'estructura de l'antigen lipídic que determina l'afinitat de la interacció del complex CD1d-Ag-TCR. L' α GalCer, el lligand més potent per a l'activació de les cèl·lules iNKT descrit fins ara, és un glicoesfingolípid (GSL) format per una galactosa unida a una ceramida (àcid gras + esfingosina) [231]. L' α GalCer activa les cèl·lules iNKT induint la secreció de citocines tant de tipus Th1 com de tipus Th2. S'han fet diferents aproximacions usant anàlegs de l' α GalCer per alterar aquest patró de secreció de citocines i per tant, modular la funció de les cèl·lules iNKT. Una de les aproximacions ha estat escurçar les cadenes lipídiques dels glicoesfingolípdids, sigui l'esfingosina (OCH) o l'àcid gras (C26:0, C16:0; C12:0, entre d'altres) [248,249,250]. Amb aquest canvi, disminuïa l'estabilitat del complex CD1d-GSL-TCR afavorint la secreció de citocines de tipus Th2. En canvi, l'anàleg α -C-GalCer, que augmentava l'estabilitat del complex CD1d- α -C-GalCer-TCR donava lloc a una resposta de tipus Th1. Canvis en la saturació de les cadenes lipídiques també modifiquen el tipus de resposta de les cèl·lules iNKT [166,167]. La presència d'insaturacions canvia la rigidesa de les cadenes lipídiques

disminuint l'estabilitat i alterant la orientació del complex CD1-GSL i per tant, poden modificar el perfil de citocines. Algunes d'aquestes alteracions lipídiques es podrien donar de manera natural durant els processos inflamatoris que es produeixen durant el desenvolupament de la T1D. La generació d'estrès causat per alteracions en els nivells de glucosa, pot generar nous antígens lipídics, que podrien activar les cèl·lules iNKT.

En aquest treball, en canvi, s'han estudiat anàlegs amb modificacions de la part polar de l' α GalCer que milloren la seva resistència a les glicosilases, de manera que són més estables i per tant, són més idonis per a usos terapèutics.

Els resultats van mostrar, que les cèl·lules iNKT tant de controls com de pacients amb T1D podien respondre a diferents anàlegs de l' α GalCer. Alguns d'aquests anàlegs feien que les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D secretessin més IL-13 que en resposta a l' α GalCer. S'obria així, la possibilitat d'usar-los per a immunoteràpia per a la T1D.

És important tenir en compte, que l' α GalCer no pot ser el lligand endogen que activa les cèl·lules iNKT, per diferents raons. Primer, que es va aïllar d'un extracte lipídic de l'esponja marina *Agelas mauritanus* [231, 252]. Segon, l'absència d'una via de síntesi fisiològica de glicoesfingolípid α -anomèrics a mamífers i l'existència d'una via de síntesi de compostos amb conformació β . L'interès es va centrar doncs, en la recerca d'antígens propis amb aquesta darrera conformació. Un d'aquests lípids és la β -GlucosilCeramida (β GluCer) [62] tot i que es va demostrar que activava les cèl·lules iNKT amb poca eficiència. Més tard, es va comprovar que el que realment activava les cèl·lules iNKT eren compostos α -anomèrics producte de la digestió enzimàtica d'aquest GSL o bé, contaminants presents a les preparacions comercials de β GluCer [232,253]. No s'ha d'excloure la possibilitat que α -glicoesfingolípid procedents de microorganismes que formen part de la microbiota gastrointestinal siguin responsables de l'activació de les cèl·lules iNKT i per tant del fenotip de memòria que caracteritza aquestes cèl·lules a humans [59,254,255]. Calen estudis per identificar el/s antígen/s endògens i analitzar els possibles canvis de concentració i estructura que es produeixen durant la resposta autoimmunitària per a poder manipular la resposta de les cèl·lules iNKT.

Així, aprofitant les característiques i funcions immunoreguladores de les cèl·lules iNKT, es pot proposar una immunoteràpia que es basi en l'expansió de cèl·lules iNKT amb glicoesfingolípid modificats que potenciïn la secreció de nivells més alts d'IL-13 que la produïda en resposta a l' α GalCer.

També s'han dissenyat teràpies basades en l'ús de cèl·lules Treg. Les estratègies que s'han proposat fins ara també tenen com a objectiu recuperar freqüències normals de cèl·lules Treg. La transferència adoptiva de cèl·lules Treg autòlogues o derivades de donants sans ha estat considerada una bona estratègia d'immunoteràpia ja que s'ha demostrat que la infusió de cèl·lules Treg aconseguia retardar el debut de la T1D en nens perquè preservaven la funció de les cèl·lules β pancreàtiques [256]. Un avantatge d'aquest sistema és que es poden expandir cèl·lules Treg autoantigen específiques. L'estimulació *ex vivo* amb anti-CD3/CD28 en presència de rh-IL2, expandeix cèl·lules Treg policlonals que no són específiques d'antigen [257], però es poden expandir en presència d'APCs carregades amb un determinant antigen peptídic i aconseguir així, Tregs més potents [235 [258]. Un altre avantatge d'aquest sistema és la possibilitat de poder controlar la dosi cel·lular administrada, però la manca de marcadors de membrana específics d'aquest llinatge cel·lular han impedit una selecció acurada de les cèl·lules Treg transferides. Finalment, una estratègia alternativa seria la conversió de cèl·lules T naive a cèl·lules Treg induïdes [136] El problema d'aquest sistema, es que s'ha vist que amb el temps, les cèl·lules Treg poden perdre l'expressió de Foxp3, adquirint un fenotip de cèl·lula T efectora que fins i tot poden arribar a ser patogèniques [139].

Arrel dels resultats presentats en aquesta tesi, es pot proposar un mètode d'immunoteràpia usant conjuntament cèl·lules iNKT i Tregs. Demostrada la capacitat de les cèl·lules iNKT de potenciar la funció de les cèl·lules Treg, s'ha pensat en la possibilitat d'usar-lo com a estratègia terapèutica.

Aquesta podria ser una bona estratègia d'immunoteràpia, ja que el fet que les cèl·lules iNKT estiguin restringides per molècules de CD1, que no són polimòrfiques, evita en part, els problemes d'histocompatibilitat interindividuals que han limitat les teràpies amb cèl·lules Treg. Aquest sistema, dóna l'avantatge de seleccionar un subgrup determinat de cèl·lules iNKT ($CD4^+$, $CD8^+$ i DN) amb característiques fenotípiques i funcionals determinades, augmentant la puresa de la població i com a conseqüència el seu efecte adjuvant.

Així, es pot proposar l'ús d'una immunoteràpia, combinant la capacitat reguladora de cèl·lules iNKT i Tregs per controlar el desenvolupament de la T1D.

Partint de la base que les cèl·lules iNKT tenen capacitat supressora i que col·laboren amb les Tregs augmentant la regulació de la resposta, seria idoni que la interacció d'ambdós tipus cel·lulars tingués lloc *in situ*. Això és possible perquè s'ha demostrat la presència de cèl·lules iNKT i Tregs funcionals al pàncrees, l'òrgan diana de la resposta a la T1D.

Per tant, amb aquests estudis, es proposen dos possibles mecanismes d'immunoteràpia usant cèl·lules iNKT i/o la combinació d'aquestes amb les Tregs amb la finalitat de retardar i/o evitar, els diferents processos autoimmunitaris desencadenants del desenvolupament de la T1D a pàncrees.

Conclusions

C. Conclusions

1. Les cèl·lules iNKT tenen capacitat reguladora perquè suprimeixen la proliferació de les cèl·lules T efectores limitant la seva secreció d'IL-2.
2. La supressió per cèl·lules iNKT és mediada per la secreció d'IL-13 i el bloqueig de la funció de la IL-13 amb un anticòs neutralitzant inhibeix aquesta supressió.
3. Les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D al debut de la malaltia no tenen capacitat supressora. Aquesta deficiència funcional correlaciona amb una disminució de la secreció d'IL-13 per aquestes cèl·lules.
4. Les cèl·lules T efectores dels pacients amb T1D i de controls sans expressen patrons diferents del receptor de la IL-13 i això explica que responguin de manera diferent a aquesta citocina.
5. És possible modular la secreció d'IL-13 per les cèl·lules iNKT amb anàlegs de l' α GalCer. Aquest efecte és més evident a les cèl·lules iNKT de pacients amb T1D que a les d'individus sans.
6. Les cèl·lules iNKT tenen un efecte adjuvant a la supressió per les cèl·lules Treg. L'addició de cèl·lules iNKT als cocultius de cèl·lules Treg:Tefs augmenta la supressió de la proliferació cel·lular.
7. L'efecte adjuvant de les cèl·lules iNKT també depèn de la secreció d'IL-13.
8. Al pàncrees de pacients amb T1D hi ha cèl·lules iNKT i Treg funcionals, reconeixen l' α GalCer i suprimeixen les T autoreactives, respectivament.
9. La freqüència d'aquestes cèl·lules augmenta al debut de la malaltia respecte dels controls, sobretot les cèl·lules iNKT, i són pràcticament indetectables a pacients amb T1D de llarga evolució.
10. La localització anatòmica al pàncrees d'aquests dos tipus cel·lulars és diferent. Al debut de la malaltia les cèl·lules iNKT es mantenen preferentment al teixit exocrí del pàncrees mentre que les cèl·lules Treg són reclutades a l'interior dels illots pancreàtics. Aquesta distribució és similar a l'observada a ratolins NOD a la mateixa etapa de la T1D.

Conclusions

C. Conclusions

1. iNKT cells have regulatory capacity to suppress the proliferation of T effector cells limiting the secretion of IL-2.
2. Cell suppression by iNKT cells is mediated by IL-13 secretion and blocking IL-13 with a neutralizing antibody inhibits the suppression.
3. iNKT cells from T1D patients at disease onset have lost the suppressor function. This functional impairment correlates with a decrease in IL-13 secretion by these cells.
4. T effector cells from T1D patients and healthy controls express different patterns of IL-13 receptor and this explains that respond differently to this cytokine.
5. Is it possible to modulate the secretion of IL-13 by iNKT cells with α GalCer analogs. This effect is most evident in iNKT cells from T1D patients than from healthy individuals.
6. iNKT cells act as adjuvants of the suppression by Treg cells. The addition of iNKT cells to the cocultures of Treg and T effector cells increases the suppression of cell proliferation.
7. The adjuvant effect of iNKT cells also depends on the secretion of IL-13.
8. iNKT and Treg cells are found in the pancreas of T1D patients and they are functional as they suppress autoreactive T cells and recognize α GalCer, respectively.
9. The frequency of iNKT and Treg cells increase at disease onset compared to healthy controls, especially that of iNKT cells, and are virtually undetectable in long-term T1D patients.
10. The pancreatic anatomical location of these two cell types is different. At the disease onset iNKT cells remain preferably in the exocrine tissue while Treg cells are recruited within the pancreatic islets. This distribution is similar to that observed in NOD mice at the same stage of T1D.

Annex I:

Estudi de la presència de cèl·lules iNKT a pacients amb la forma relapsing-remitting d'esclerosi múltiple (RRMS)¹¹

A1. 1. Introducció

L'esclerosi múltiple (MS) és una malaltia inflamatòria del sistema nerviós central (CNS) caracteritzada per lesions multifocals a la matèria blanca del cervell amb un infiltrat inflamatori prominent que s'associa a zones de desmielinització, dany axonal i formació de cicatrius glials [1]. No es coneix del tot la seva etiologia però hi ha evidències que suggereixen que la forma recaiguda-remissió MS (RR-MS) i la forma crònica progressiva MS(SP-MS), considerades patogènicament idèntiques i que evolucionen l'una a partir de l'altra (SP-MS evolucionària de RR-MS) (Fig. 1), es desenvoluparien en individus predisposats genèticament com a conseqüència de l'efecte de factors ambientals [1,2,3].

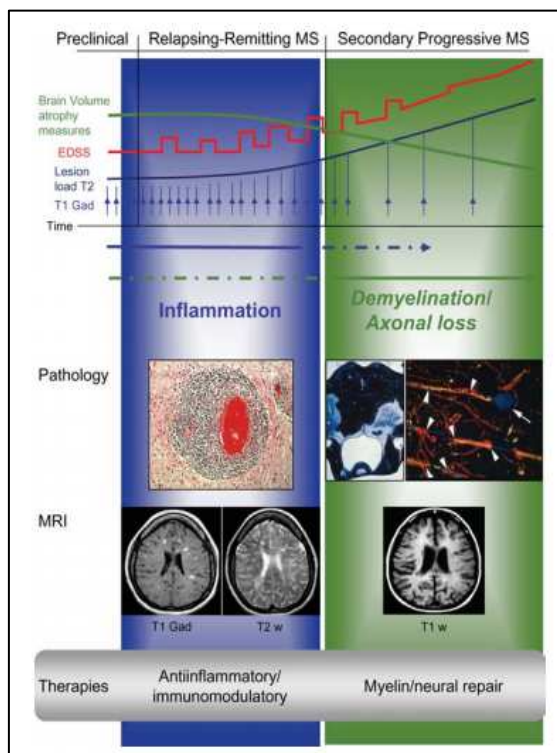


Figura . Esquema de l'evolució clínica de MS. Representació de l'escala clínica de la malaltia (línia vermella), càrrega de lesions (T2, línia blava), freqüència d'esdeveniments inflamatoris (T1) i atròfia cerebral (línia verda). La part blava (esquerra) mostra el tipus més freqüent d'Esclerosi Múltiple trobada en un 85-90% dels pacients, l'anomenada Relapsing-Remitting (RR)-MS. La majoria d'aquests pacients passen a desenvolupar (SP)-MS, esclerosi múltiple secundària progressiva (part verda). (Mireia Sospedra and Roland Martin. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23:683–747).

S'ha descrit, que la MS comença amb l'activació de cèl·lules T CD4⁺ autoreactives i la seva diferenciació a Th1 i possiblement a Th17. Tot i així, altres components del sistema immunitari estan implicats en el dany tissular del Sistema Nerviós Central (SNC), com anticossos específics, el sistema del complement, cèl·lules T CD8⁺ i factors produïts/secretats per cèl·lules de la immunitat innata.

Es creu que alteracions en els mecanismes de regulació, així com cèl·lules de tipus Th2, cèl·lules T reguladores (Treg) o cèl·lules NKT, poden ser responsables, en part, de les fases de recaiguda-remissió (RRMS) durant la qual les cèl·lules T immunoreguladores podrien controlar la resposta immunitària produïda per les cèl·lules de tipus Th1 [4].

Les característiques neuropatològiques de l'MS es poden reproduir en el model animal d'encefalomielitis autoimmunitària experimental (EAE) immunitzant amb proteïnes de la mielina, així com la proteïna bàsica de la mielina (MBP), la proteïna proteolipídica (PLP) o la glicoproteïna de la mielina dels oligodendròcits (MOG) [1] que es consideren els autoantígens diana de la resposta autoimmunitària. A MS, com a d'altres malalties autoimmunitàries, es dona una resposta tant de tipus cel·lular com de tipus humoral contra diversos lípids, els quals constitueixen fins el 70% de la beina de mielina [5,6,7, 8,9,10,11].

Les cèl·lules NKT són cèl·lules T CD3⁺ que expressen marcadors de cèl·lules NK com CD56, CD161 (NK1.1), NKG2D, CD94 entre altres. Tenen fenotip de cèl·lula T activada i poden reconèixer antígens lipídics en el context de CD1 [12]. Dins les cèl·lules NKT distingim les que estan restringides per CD1a, b, c o d que expressen un TCR divers, i les cèl·lules iNKT que estan restringides per CD1d i que expressen una cadena alfa del TCR invariant V α 24J α 18 associada preferentment a V β 11 en el cas d'humans [13]. S'ha demostrat que les cèl·lules NKT reconeixen antígens lipídics derivats de la mielina: com gangliòsids [9], sulfatida [14], esfingomielina [15] i altres lípids endògens [16].

S'ha descrit que la molècula de CD1d, es troba expressada a nivell del SNC. La seva expressió s'ha detectat a la microglia i astròcits reactius a les vores de les plaques desmielinitzants on l'expressió està incrementada [17,18]. Les cèl·lules B que envolten els capil·lars sanguinis en aquest mateix teixit també expressen CD1d.

A pacients amb MS, es produeix un increment de limfòcits T circulants específics per diferents antigens procedents de la mielina i glicolípidis neutres que poden ser presentats per molècules de CD1d i per tant, reconeguts per cèl·lules iNKT. A més, la freqüència i patró de síntesi de citocines de les cèl·lules iNKT canvia a les diferents etapes de la malaltia a pacients amb Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (RRMS) [19]. De fet, es produeixen augments transitoris en el nombre de cèl·lules iNKT al líquid cefaloraquídi (CSF), i de manera ocasional a PBMCs, sobretot a la fase de recaiguda de la malaltia [19,20].

El grup de la Dra. Sospedra (Departament de Neurologia, Hospital Universitari de Zurich) va tenir accés a una mostra de cervell d'una pacient que va morir degut a una forma molt agressiva de MS. Els estudis d'espectratyping realitzats amb aquesta mostra van descriure l'expressió de les cadenes $V\alpha 24$ i $V\beta 11$ del TCR al líquid cefaloraquídi (CSF) i a les lesions cerebrals actives d'aquest teixit. Les dades obtingudes van suggerir la presència de cèl·lules iNKT al teixit diana de la resposta autoimmunitària (Fig. 2).

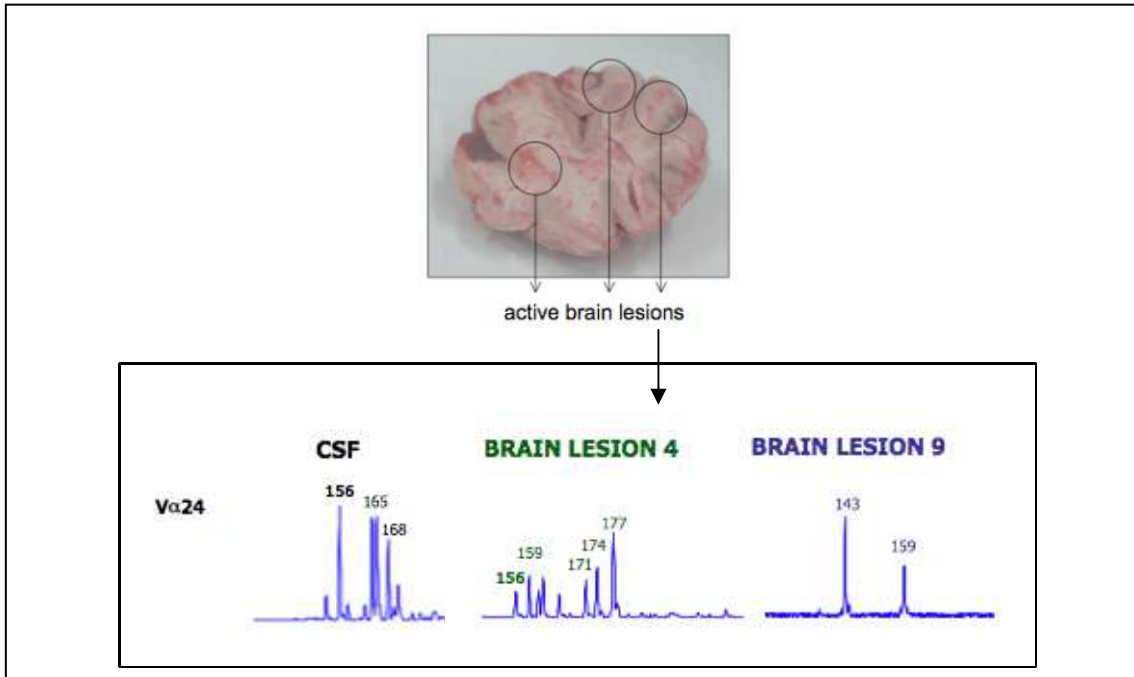


Figura 2. Estudi del repertori de la cadena α del TCR $V\alpha 24$ a CSF i a lesions cerebrals de la pacient amb RRMS: A la imatge s'observa l'anàlisi per espectratyping corresponent a l'amplificació de $V\alpha 24$ a CSF i a dues lesions cerebrals de la pacient amb RRMS.

A1.2. Objectiu

L'objectiu general d'aquest treball va ser estudiar la presència de cèl·lules iNKT a pacients amb la forma relapsing-remitting d'esclerosi múltiple (RRMS) i determinar si és possible, el seu paper, ja sigui patogènic o regulador. Per tant, com a objectius concrets:

- 1) Determinar la presència de cèl·lules iNKT a CSF i lesions cerebrals d'una pacient amb RRMS i comparar-la amb la freqüència a PBMCs del mateix pacient i d'altres amb la mateixa forma de la malaltia.
- 2) Determinar l'expressió de CD1d a lesions cerebrals i zones de no lesions d'una pacient amb RRMS.
- 3) Caracteritzar i comparar les diferents subpoblacions de cèl·lules iNKT ($CD4^+$, $CD8\beta^+$ i DN) a PBMCs de pacients amb RRMS i controls sans.

A1. 3. Material i mètodes

3.1 Mostres

Es va estudiar la presència de cèl·lules iNKT a líquid cefaloraquídi (CSF) (n=1) i lesions cerebrals (L3, L4 i L9) (n=3) d'una pacient amb RRMS, una dona de 36 anys que va morir a l'any 2008 com a conseqüència d'una forma molt agressiva de MS a la University Medical Center Hamburg-Eppendorf. També es van analitzar mostres de PBMCs de pacients amb RRMS (n=29) i de controls sans (n=26) (Taula. 1).

Tot el material estudiat es va obtenir amb el consentiment informat i amb l'aprovació del comitè d'ètica local de la Ärztekammer of the City of Hamburg (No. 2758).

Taula 1. Dades dels pacients amb RRMS. Nombre de pacients, edat, sexe i EDSS.

| Pacients | Malaltia | Edat | Sexe | | EDSS | | | |
|----------|----------|-------|------|----|------|-----|-------|----|
| | | | F | M | ND | 0-2 | 2,5-4 | >4 |
| 26 | RRMS | 20-70 | 14 | 12 | 9 | 11 | 5 | 1 |

3.2 Cultius cel·lulars

La quantitat de cèl·lules obtingudes a partir de la mostra de CSF va ser relativament baixa, per tant, es van expandir *in vitro*. Es van posar en cultiu les cèl·lules del CSF obtingudes amb medi IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium), suplementat amb un 10% de Sèrum Humà, Penicilina (100 U/ml), Streptomina (100µg/ml) i L-Glutamina (2 mM). A aquests cultius es van afegir PBMCs autòlegs irradiats (30Gy) i com a estímul, es va afegir PHA-L (1µg/ml). A les 24 hores de cultiu es va afegir rh-IL2 (20U/ml) i durant dos setmanes es va anar reemplaçant medi fresc, el qual contenia rh-IL2 (20U/ml). Seguidament, les cèl·lules es van fenotipar, usant anticossos monoclonals específics i van ser criopreservades fins al seu ús.

3.3 Extracció de RNA i Retrotranscripció: Síntesi de cDNA

A partir de la mostra de CSF (n=1) i les mostres de lesions cerebrals (n=3) d'una pacient amb RRMS, es va fer l'extracció de RNA seguint el protocol d'extracció del kit "RNeasy Plus Mini" de QUIAGEN ([material i mètodes](#)) i el RNA obtingut es va quantificar usant el Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

Per passar el RNA de les diferents mostres a DNA complementari (cDNA) es va dur a terme la retrotranscripció seguint el protocol corresponent ([veure material i mètodes](#)). El programa del termociclador per a la retrotranscripció va ser el següent: un primer pas de pre-shock a 65°C durant 5 minuts seguit d'una incubació en gel de 5 min. Un segon pas d'incubació d'1h a 55°C, seguit de 15 minuts a 70°C i 2 minuts a 4°C.

3.4 Reacció en cadena de la Polimerasa (PCR)

3.4.1 Anàlisi del TCR invariant V α 24J α 18 de les cèl·lules iNKT

Per a determinar la presència de cèl·lules iNKT a CSF i a les lesions cerebrals del pacient amb RRMS, es va dur a terme una PCR convencional basada en l'expressió de la cadena alpha del TCR invariant específic (V α 24J α 18) de les cèl·lules iNKT. Primerament, es va analitzar l'expressió de V α 24/C α fent servir primers específics per V α 24 (5' CTGGATGCAGAACAAAGCAGAGC 3' de Sigma Aldrich Home) i per la cadena constant del TCR, C α (5' GTTGCTAGGCCGCGGCACTGTT 3' de Sigma Aldrich Home). El programa d'amplificació a seguir va ser el següent: desnaturalització a 95°C durant 2 min, seguit de 35 cicles d'1 min a 95°C, 1 min a 65°C i 1 min a 72°C, seguit d'un cicle d'elongació final a 72°C durant 10 min. El producte de l'amplificació es va córrer en un gel al 2% d'agarosa, es va tallar la banda corresponent al fragment de V α 24C α i es va purificar seguint el protocol corresponent al kit "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" de (Promega). El producte obtingut es va reamplificar utilitzant primers específics per V α 24 i la cadena alpha del segment J del TCR, J α 18 (5' AGGCCAGACAGTCAACTGAGTTCC 3' de Sigma Aldrich Home). El programa d'amplificació en aquest cas va ser el següent: Un cicle de desnaturalització a 95°C durant 2 min, seguit de 35 cicles de desnaturalització a 95°C durant 30 segons, una fase d'annealing a 61°C durant 30 segons i un pas d'extensió de 72°C durant 30 segons, seguit d'un últim pas d'elongació final a 72°C durant 5 min.

3.4.2 Anàlisi de l'expressió de CD1

Per a determinar l'expressió de CD1d a les mostres de CSF, lesions cerebrals i zones de no lesió (NL), es va fer una PCR convencional utilitzant primers específics per CD1d ([Taula 2](#)). L'expressió de CD1a, CD1b i CD1c a les mateixes mostres es va determinar utilitzant primers específics per cada un d'ells ([Taula. 2](#)). El programa d'amplificació en tots els casos va ser el següent: Un cicle de desnaturalització a 95°C durant 2 min, seguit de 35 cicles de PCR que consistien en una desnaturalització a 95°C durant 30

segons, una fase d'anuealing a 60°C durant 30 segons i un pas d'extensió de 72°C durant 30 segons, seguit d'un últim pas d'elongació final a 72°C durant 5 min.

| Primer | Seqüència | Tª Fusión | Tª annealing | Tamany |
|--------|------------------------------------|-----------|--------------|--------|
| CD1a | Fw: 5- TGTTAGCTGTTCTCCAGGTGA-3 | 65,9 °C | 60 °C | 81 pb |
| | Rv: 5- AGGATGCGATCCAGATGACAT-3 | 65,7 °C | | |
| CD1b | Fw: 5- CCATTCAACTGTTAGCTGTTCTCTT-3 | 64,4 °C | 60 °C | 73 pb |
| | Rv: 5- GAAAGGAGGTCGGCCCC-3 | 67,0 °C | | |
| CD1c | Fw: 5- TGGTGACAATGCAGACGCA-3 | 68,1 °C | 60 °C | 71 pb |
| | Rv: 5- GGTTGACAAATGAGAAGATCTGGA-3 | 65,2 °C | | |
| CD1d | Fw: 5- AGCGCTGAAGTCCCGCA-3 | 68,7 °C | 60 °C | 64 pb |
| | Rv: 5- TATTGGCGAAGGACGAGATCTG-3 | 67,3 °C | | |

Taula. 2 Seqüència d'oligonucleòtids específics per l'amplificació de CD1. La taula mostra la seqüència de cada primer específic per cada molècules de CD1 (a, b, c i d), la Tª de fusió i d'anuealing de cada un dels primers i el parells de bases (pb) de l'amplímer resultant.

3.5 Anàlisi del producte de PCR en gel d'agarosa

Els productes obtinguts, resultant de les PCR realitzades (V α 24J α 18, CD1a, b, c i d) es van analitzar en un gel d'agarosa al 2% en un volum final de 50 μ L de TAE al 1x. Es va retallar la banda corresponent al tamany de cada un dels amplímers i es van purificar seguint el protocol corresponent al kit "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System" de Promega.

3.6 Seqüenciació

El producte purificat va ser seqüenciat directament al servei de seqüenciació ràpida "Microsynth AG" (Zurich, Suïssa). Cada una de les seqüències s'obtingué per duplicat partint de cadascun dels dos primers (Forward i Revers). S'estudià els cromatogrames obtinguts amb el software *Chromas*, es comprovà que totes les seqüències no tenien aparentment cap error i s'alinearen mitjançant l'ús del programa online *Clustal W*. Finalment, fent un *Blast* es va comprovar a que gen corresponia el producte seqüenciat. En el cas dels estudis dels TCRs, a part de l'anàlisi esmentat, es va usar l'eina online *IMGT/V-QUEST* per veure a quina cadena α i β corresponia cada un del segments obtinguts.

3.7 Clonació i Transformació

El material obtingut, purificat i seqüenciat de l'amplificació corresponent a CD1a, b, c i d es van clonar utilitzant el pGEM-T Easy Vector de Promega. Per duu a terme la transformació, és van barrejar 2 μ l de lligació amb cèl·lules competents i es va incubar a 37°C durant 1h amb agitació constant. Seguidament, les cèl·lules es van sembrar en plaques de petri amb medi selectiu diferencial (LB + Agar + Ampicilina + IPTG i X-Gal) i es van deixar o/n a 37°C. A l'endemà, es van picar les colònies blanques (que són les

que tenien l'insert) és van fer les minipreps corresponents utilitzant el kit "Plasmid Miniprep Kit I" d'Invitrogen i el producte obtingut va ser seqüenciat tal i com s'ha esmentat anteriorment a l'apartat 3.6.

3.8 Protocols de tinció

3.8.1 Tinció superficial: Subpoblacions de cèl·lules iNKT

La caracterització de les diferents subpoblacions de cèl·lules iNKT a PBMCs de pacients amb RRMS (n=26) i PBMCs de controls sans (n=29), es va determinar per citometria de flux usant el BD FACSCanto™ i analitzant les dades amb el software BD FACSDiva™. Per a la caracterització de les diferents poblacions, es van usar una combinació d'anticossos monoclonals específics contra la cadena α del TCR invariant V α 24J α 18 PE, V β 11 FITC, CD3 PE-Cy7, CD4 APC i CD8 β PE-Cy5 (Taula. 3).

| Cèl·lules en suspensió | | | |
|--------------------------------|-------------|---------------|--------------------|
| Cèl·lules iNKT | | | |
| Especificitat | AcMo | Isotip | Procedència |
| TCR V α 24J α 18 | 6B11 | IgG1 | Milteny Biotec |
| TCR V β 11 | C21 | IgG2a | Beckman Coulter |
| CD3 | UCTH1 | IgG1 | Biolegend |
| CD4 | RPA-T4 | IgG1 | eBiosciences |
| CD8 $\alpha\beta$ | 2ST8.5H7 | IgG2a | eBiosciences |

Figura 3. Panell d'anticossos monoclonals usats per a la determinació dels diferents subgrups de cèl·lules iNKT. Al quadre s'observa els anticossos utilitzats, per a la determinació dels diferents subgrups de cèl·lules iNKT, així com el clon, l'isotip i la procedència corresponent a cada un d'ells.

A1. 4. Resultats

4.1 Presència de cèl·lules iNKT al CSF però no a les lesions cerebrals de la pacient amb RRMS

Per a determinar la presència de cèl·lules iNKT a CSF i lesions cerebrals d'una pacient amb RRMS, es va analitzar l'expressió del TCR invariant $V\alpha 24J\alpha 18$ específic de les cèl·lules iNKT per PCR convencional en aquestes mostres. Els resultats van mostrar la presència de cèl·lules iNKT a la mostra de CSF, però no es va detectar la seva presència a les lesions cerebrals de la mateixa pacient (Fig. 3). Com a control positiu de l'amplificació es van usar PBMCs d'individus sans.

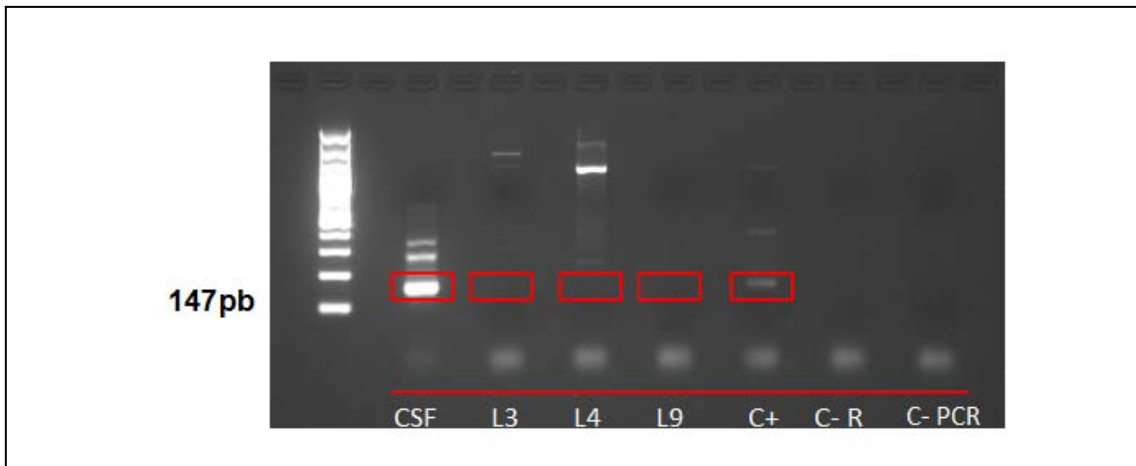


Figura 3. Amplificació per PCR de la cadena α del TCR invariant $V\alpha 24J\alpha 18$ a CSF i lesions cerebrals de la pacient amb RRMS: A la imatge s'observa l'expressió de la cadena α del TCR invariant $V\alpha 24J\alpha 18$ de les cèl·lules iNKT, a CSF i lesions cerebrals (L3, L4 i L9) de la pacient amb RRMS. PBMCs de donants sans es van usar com a control positiu de l'amplificació.

4.2 Expressió de CD1d a les lesions cerebrals de la pacient amb RRMS

Per a determinar l'expressió de les diferents molècules de CD1 a les lesions cerebrals i zones de no lesió de la pacient amb RRMS, es va fer una PCR convencional utilitzant primers específics per cada una de les molècules de CD1. Els resultats van mostrar la detecció l'expressió de CD1d només a una de les dos lesions cerebrals analitzades (L4). Tot i així, no es va detectar l'expressió de CD1d a les zones no lesionades de la mateixa mostra (NL1, NL2). Cap de les altres molècules de CD1, ni CD1a, b ni c, es va detectar ni a les lesions cerebrals ni a les zones de no lesió de la pacient amb RRMS (Fig. 4).

Per a confirmar aquestes dades, de cada una de les mostres analitzades, es va tallar i purificar la banda de la zona corresponent a la mida de l'amplímer de cada CD1 amplificat, es va clonar i es va tornar a seqüenciar. Les dades obtingudes a partir de la clonació tampoc van poder determinar l'expressió de CD1a, b ni c a les zones de lesió L3 i L4 ni a les zones no lesionades NL1 i NL2, ni tampoc l'expressió de CD1d a L3, NL1 i NL2.

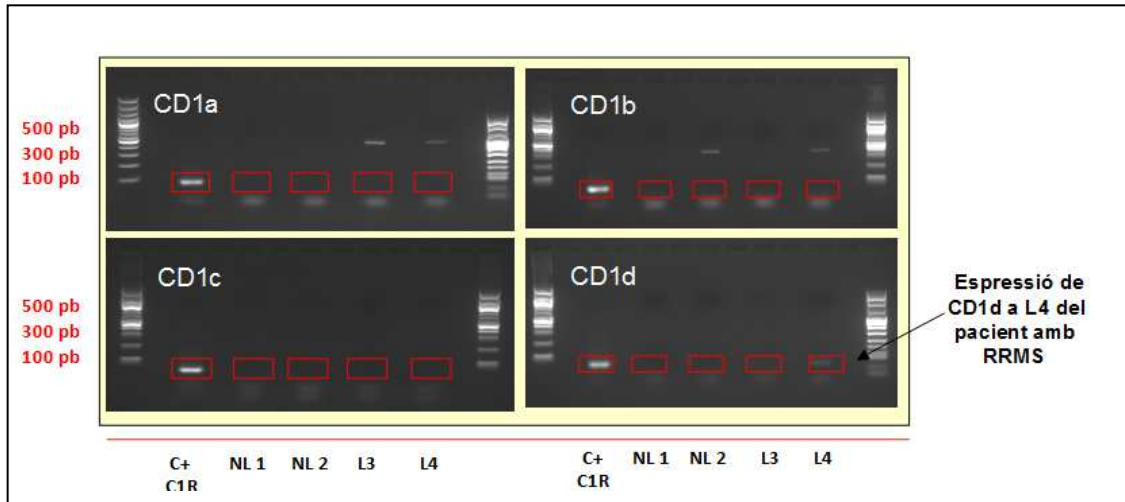


Figura 4. Amplificació de les molècules de CD1 per PCR convencional: La imatge mostra l'expressió de CD1a, b, c i d a lesions cerebrals (L3 i L4) i zones de no lesió (NL1 i NL2) d'una mostra d'una pacient amb RRMS. Només s'observa expressió de CD1d a una de les lesions cerebrals analitzades (L4) però no es detecta expressió de cap dels altres CD1s analitzats.

4.3 Defectes en la determinació de cèl·lules iNKT a mostres de CSF d'una pacient amb RRMS

L'anàlisi per citometria de flux de la presència de cèl·lules iNKT a PBMCs i a CSF de la pacient amb RRMS, va donar un resultat negatiu (Fig. 5), ja que no es van detectar cèl·lules $V\alpha 24J\alpha 18^+V\beta 11^+$. Aquest resultat, possiblement, va ser degut a que aquestes mostres havien estat prèviament expandides *in vitro* amb un estímul policlonal, el qual afavoreix principalment la proliferació de limfòcits T $CD4^+$ d'una manera no específica, desfavorint la proliferació de les cèl·lules iNKT. L'estimulació amb un mitogen, fa que la baixa freqüència de cèl·lules iNKT (0.1-0.3% del total de cèl·lules T a humans), acabi desapareixent amb aquest tipus d'estimulació, i per tant, arribin a ser indetectables.

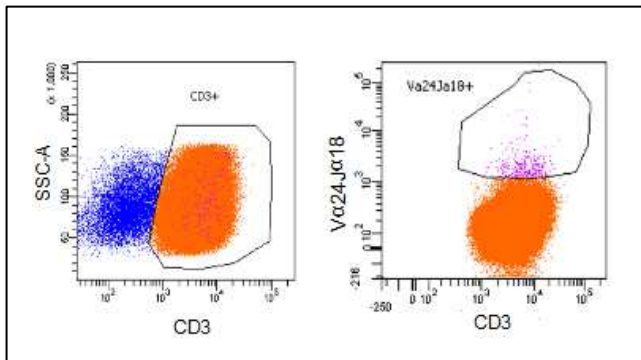


Figura 5. Freqüència de cèl·lules iNKT a CSF de pacients amb RRMS estimulats amb PHA-L: Als dotblots s'observa la freqüència de cèl·lules iNKT a CSF de la pacient amb RRMS estimulats amb PHA-L, analitzades per citometria de flux.

4.4 Baixa freqüència de cèl·lules iNKT a pacients amb RRMS

Els resultats obtinguts per citometria de flux respecte a la caracterització i comparació de les diferents subpoblacions de cèl·lules iNKT a mostres de controls i de pacients amb RRMS, van mostrar que la freqüència de cèl·lules iNKT a pacients amb RRMS era més baixa que a individus controls (Fig. 6), tal i com ja ha estat descrit prèviament [19].

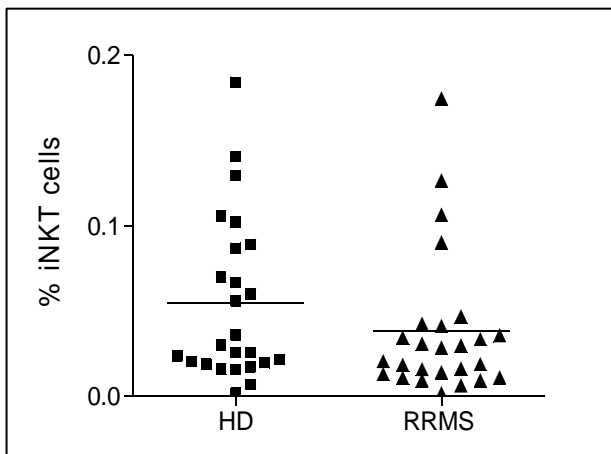


Figura 6. Freqüència de cèl·lules iNKT a controls sans (HD) i pacients amb RRMS: A la gràfica s'observa la comparació entre el percentatge de cèl·lules iNKT a HD (n=25) i pacients amb RRMS (n= 26).

Quan es van caracteritzar les diferents poblacions de cèl·lules iNKT en aquestes mateixes mostres, els resultats van mostrar una disminució de cèl·lules iNKT-CD4⁺ i iNKT-DN a pacients amb RRMS comparada amb la freqüència a individus sans. La diferència entre la freqüència de cèl·lules iNKT-CD4⁺ a controls (HD) i a pacients amb RRMS va ser estadísticament significativa (p=0,0391). Contràriament, la diferència en la població de cèl·lules iNKT-DN no va ser estadísticament significativa, tot i que es va observar una certa tendència a estar disminuïdes a pacients amb RRMS. Pel que fa a la població de cèl·lules NKT-CD8β⁺ no es van trobar diferències entre HD i pacients (Fig. 7).

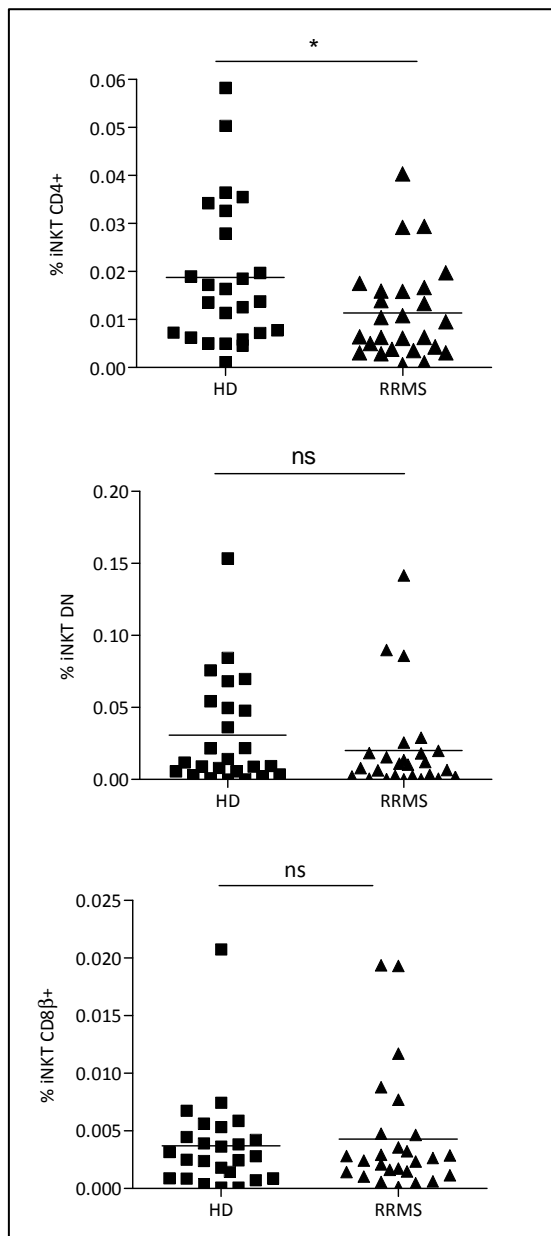


Figura 7. Anàlisi de la freqüència dels diferents subgrups de cèl·lules iNKT a controls i pacients amb RRMS. A la gràfica es compara el percentatge de cèl·lules iNKT-CD4⁺, iNKT-CD8β⁺ i iNKT-DN a PBMCs, entre controls (HD) i pacients amb RRMS. Usant una T-student, les diferències van ser estadísticament significatives entre el % de cèl·lules iNKTCD4⁺ HD vs iNKTCD4⁺ RRMS (p=0,0391).

Donat que la mitjana d'edat dels controls sans era inferior a la de pacients amb RRMS es va voler comprovar si els canvis de freqüència observats entre els diferents subgrups de cèl·lules iNKT, podia ser resultat d'aquesta diferència, ja que en previs estudis s'havia descrit que a PBMCs de controls sans la freqüència de cèl·lules iNKT disminuïa amb l'edat [21]. En el nostre cas, els resultats van mostrar que, contràriament al que s'havia descrit prèviament a controls sans, la menor freqüència de cèl·lules iNKT no es correlacionava amb l'edat dels pacients i per tant, era atribuïble directament al procés autoimmunitari (Fig. 8). Tot i així, es va observar una certa tendència de les iNKTS-CD4⁺ a disminuir amb l'edat als

pacients amb RRMS però les dades no van ser estadísticament significatives en cap dels casos.

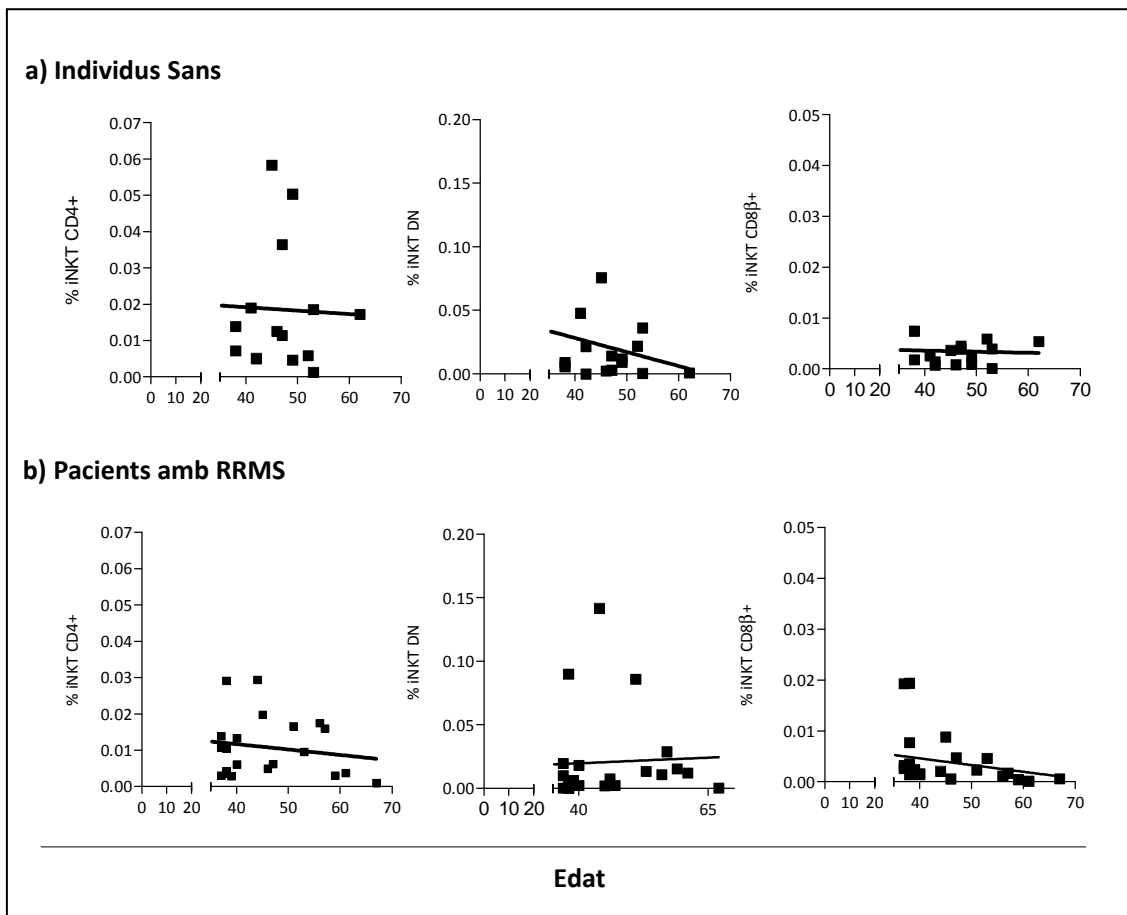


Figura 8. Correlació entre l'edat i la freqüència de cèl·lules iNKT a controls i a pacients amb RRMS: Les gràfiques mostren la correlació entre la freqüència dels diferents subgrups de cèl·lules iNKT ($CD4^+$, $CD8^+$ i DN) amb l'edat, tant a les mostres de HD (dalt) com a la dels pacients amb RRMS (baix).

A més a més, es va analitzar si el percentatge de cada subgrup de cèl·lules iNKT correlacionava amb la severitat de la malaltia mesurada en funció de l'EDSS o també anomenat "Expanded Disability Status Scale" [22]. Les dades van mostrar una certa correlació entre la població de cèl·lules iNKT- $CD4^+$ i el EDSS. Així, el % de cèl·lules iNKT- $CD4^+$ va disminuir quan més elevat era l'EDSS. Contràriament, no es van detectar diferències en la població de cèl·lules iNKTs- $CD8\beta^+$ ni les iNKTs-DN (Fig. 9).

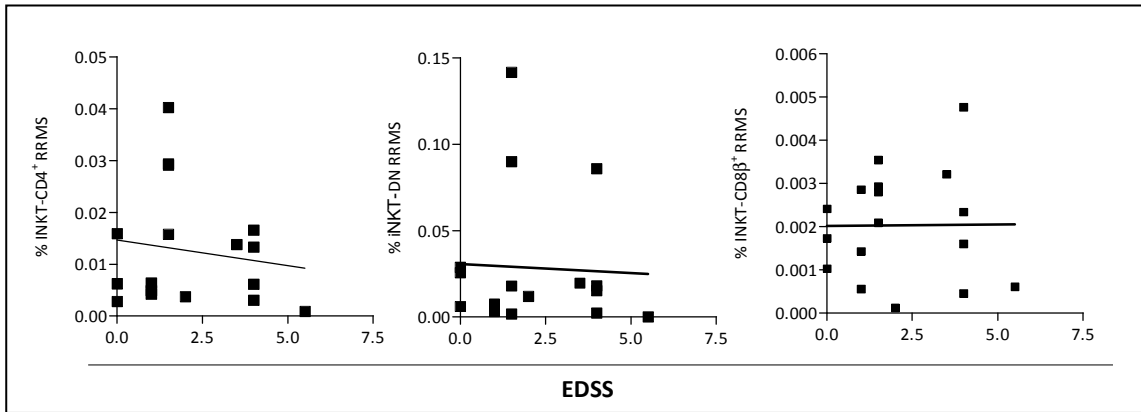


Figura 9. Correlació entre l'EDSS i el % de les diferents subpoblacions de cèl·lules iNKT: Les gràfiques mostren la correlació entre les diferents subpoblacions de cèl·lules iNKT i l'EDSS "Expanded Disability Status Scale" dels pacients amb RRMS.

A1.6. Discussió

En aquest treball s'ha analitzat la presència de cèl·lules iNKT a una mostra de líquid cefaloraquídi (CSF) i mostres de lesions cerebrals d'una pacient amb RRMS i ho hem intentat comparar amb la freqüència de cèl·lules iNKT trobades a PBMCs de la mateixa pacient i d'altres pacients amb RRMS. A més, es va analitzar l'expressió de CD1d a les lesions cerebrals i zones de no lesions de la pacient amb RRMS. Per últim, es van caracteritzar i comparar les diferents subpoblacions de cèl·lules iNKT ($CD4^+$, $CD8\beta^+$ i DN) a PBMCs de pacients amb RRMS i de controls sans.

Per una part, les nostres dades, van confirmar l'expressió de CD1d a una de les lesions cerebrals (L4) de les dues analitzades d'una pacient amb RRMS, però no es va detectar l'expressió ni de CD1a, b ni c a cap d'elles ni a les zones de no lesió de la mateixa pacient (NL1 i NL2). Aquestes dades són concordants amb estudis previs, on es va demostrar l'expressió de CD1d a nivell del SNC. L'expressió de CD1d a nivell del SNC, fa que la disrupció de la mielina i la fagocitosis produïda per la micròglia local i els macròfags dels productes obtinguts (derivats de la mielina), siguin presentats a cèl·lules T, per molècules de CD1d localitzades als llocs d'inflamació del SNC [23]. Concordant amb això, d'altres estudis, van mostrar un increment en el número de cèl·lules T circulants que podien reconèixer diferents antígens lipídics propis, així com la sulfatida, antigen derivat de la mielina, entre d'altres, els quals podien ser presentats per molècules de CD1d al SNC [24,25,26]. Estudis més recents, van mostrar l'expressió de CD1d a les voreres de les plaques desmielitzants del SNC [22] i fins i tot a les cèl·lules de Schwann del SNP [27].

Tot i que en als nostres estudis l'expressió de CD1a, b i c no es va detectar a les lesions cerebrals analitzades, estudis previs si que van descriure l'expressió de la molècula CD1b a lesions de pacients amb Esclerosis múltiple crònica activa, però no a zones de no lesions o lesions silencioses, tal i com també s'ha pogut observat en els nostres estudis [28]. El fet de trobar l'expressió de CD1d a una de les lesions cerebrals podria suggerir la presència de cèl·lules iNKT en aquella lesió. Contràriament al que es podria pensar, quan es va analitzar a la mateixa mostra de lesió cerebral, l'expressió del TCR invariant específic de les cèl·lules iNKT $V\alpha 24J\alpha 18$, aquest no es va detectar, tot i que, si es va detectar a CSF de la mateixa pacient amb RRMS. Aquestes dades estarien d'acord amb dades prèvies, on es va reportar que a lesions cerebrals de pacients amb RRMS, els quals van presentar baixa freqüència de cèl·lules iNKT a PBMCs i CSF, rarament es va detectar l'expressió del $TCRV\alpha 24J\alpha 18$ [29].

Degut a la poca quantitat de cèl·lules obtingudes des del CSF de pacients amb RRMS, les cèl·lules es van haver d'expandir *in vitro* amb PHA-L amb la finalitat d'obtenir més quantitat de cèl·lules iNKT per poder treballar. Les anàlisis per citometria de flux no van detectar cèl·lules positives per $V\alpha 24J\alpha 18^+V\beta 11^+$, possiblement, degut a l'estimulació *in vitro* usant un estímul policlonal, el qual no és específic de cèl·lules iNKT i afavoreix la proliferació de limfòcits T $CD4^+$ però desafavoreix la proliferació d'un grup molt reduït de cèl·lules, com són les cèl·lules iNKT. Per tant, com amb aquestes mostres expandides amb PHA-L, les possibles cèl·lules iNKT ja s'havien perdut, es va voler comparar la freqüència de cada un dels subgrups de cèl·lules iNKT de PBMCs entre individus sans (HD) i pacients amb RRMS, evitant expandir les cèl·lules *in vitro*. Els resultats van mostrar que la freqüència de cèl·lules iNKT era més baixa a pacients amb RRMS que a individus sans. Aquestes dades concorden amb estudis previs on es va reportar que les cèl·lules iNKT $V\alpha 24J\alpha Q$ estaven reduïdes a pacients amb MS, no només en número, sinó també en la seva capacitat de producció de citocines. La baixa freqüència de cèl·lules iNKT en aquests estudis es va demostrar per l'ús d'anticossos anti- $V\alpha 24$ /anti- $V\beta 11$ i usant tincions amb tetràmers de CD1d carregats amb $\alpha GalCer$ [19,30,31,32,33]. Contràriament als nostres resultats, previs articles van descriure que el número de cèl·lules iNKT a la MS humana era normal i que el problema no era la freqüència, sinó els canvis de fenotip en els diferents subgrups de cèl·lules iNKT [34]. A més a més, diferents estudis usant ratolins amb EAE els quals eren deficientes en cèl·lules iNKT, van indicar que possiblement les cèl·lules iNKT podrien no estar implicades en la regulació de la malaltia, ja que ratolins knock-out per $CD1d^{-/-}$ i per $J\alpha 18^{-/-}$ i per tant, absents de cèl·lules iNKT, van patir el curs de la malaltia, d'una manera similar a com ho feien els ratolins "wild type" [35].

Ja que en estudis previs s'havia descrit que a PBMCs de controls sans la freqüència de cèl·lules iNKT disminuïa amb l'edat [36], es va voler comparar si la disminució de la freqüència de cèl·lules iNKT observada a RRMS era conseqüència de l'edat, ja que la majoria del donants sans analitzats eren més joves que els pacients amb RRMS. Els nostres resultats van mostrar que, contràriament al que s'havia descrit, la menor freqüència de cèl·lules iNKT no es correlacionava amb l'edat dels pacients i per tant, es podria suggerir que era atribuïble directament al procés autoimmunitari.

Quan es van analitzar les diferències entre subgrups de cèl·lules iNKT entre individus sans i pacients amb RRMS, els resultats van mostrar que la freqüència de cèl·lules iNKT- $CD4^+$ i cèl·lules iNKT-DN tendien a disminuir a pacients amb RRMS respecte d'individus sans, però en canvi, no es van trobar diferències a nivell de les cèl·lules iNKT- $CD8\beta^+$. Si considerem el fet que la RRMS es una malaltia que té fases de relapsing-remiting i ho relacionem amb el fet de que els diferents subgrups de cel·lules iNKT produeixen un patró diferent de citocines, podria ser que depenent la fase de la malaltia predomini

un subgrup de cèl·lules iNKT o un altre. Així, aquestes dades estarien d'acord en part, amb dades publicades prèviament, on es va mostrar que les cèl·lules iNKT-DN, però no les iNKT-CD4⁺ estaven significativament reduïdes durant la fase de remissió de la malaltia [19,31]. D'altres estudis, van descriure una correlació entre la freqüència de cèl·lules iNKT de tipus Th2 i per tant, cèl·lules que secreten citocines reguladores, amb la fase de remissió de la malaltia, suggerint que aquestes cèl·lules iNKT durant aquesta fase podrien potenciar la regulació de la malaltia [19].

Considerant que les mostres dels pacients amb RRMS tenien diferent EDSS, es va analitzar si la freqüència de cada un dels subgrups de cèl·lules iNKT correlacionava amb la severitat de la malaltia (EDSS). Els resultats van mostrar, que la freqüència de cèl·lules iNKT-CD4⁺ però no les cèl·lules iNKT-CD8β⁺ i iNKT-DN tendien a disminuir en funció de l'augment de l'EDSS, tot i que les dades no van ser estadísticament significatives.

La freqüència dels diferents subgrups de cèl·lules iNKT a la RRMS podria estar relacionada amb la homeòstasi de cada un dels diferents subgrups, ja que la homeòstasi és diferent si es tracta de cèl·lules iNKT-CD4⁺ o iNKT-CD4⁻ (iNKT-CD8β⁺ i les iNKT-DN). El timus humà amb l'edat, pateix un procés anomenat "involució tímica", on aquest s'acaba omplint de teixit adipós i acaba perdent la seva funcionalitat. Curiosament, s'ha vist que a pacients amb RRMS l'involució tímica és dóna abans que en controls sans. El número de iNKT-CD4⁺ és principalment mantingut per l'anomenat "thymic output" i la seva supervivència a perifèria és mantinguda principalment pel número de divisions cel·lulars. Pel contrari, el número de cèl·lules iNKT-CD8⁺ o iNKT-DN depèn principalment de la seva expansió a perifèria [37]. Totes aquestes dades, podrien estar relacionades amb el fet que trobem que la freqüència de cèl·lules iNKT-CD4⁺ a PBMCs de pacients amb RRMS tinguin tendència a disminuir a sang perifèrica comparat amb els controls sans, fet no observable en la freqüència de cèl·lules iNKT-CD8β⁺. La homeòstasi de les cèl·lules iNKT és dependent en part, de les citocines IL-15 i IL-7 i això pot influenciar al seu desenvolupament [38,39,40]. Les cèl·lules iNKT-CD4⁺, les quals depenen més del thymic output expressen alts nivells de IL7R i per tant, responen millor a IL-7 que les iNKTs-CD4⁻ que expressen més IL15R i responen millor a IL-15 [41]. Per tant, els requeriments a nivell de citocines i l'involució tímica precoç que es dóna en els pacients amb RRMS, podria determinar la disminució de la freqüència de cèl·lules iNKT-CD4⁺ amb l'edat als pacients amb RRMS.

Així, en resum, els estudis aquí mostrats mostren que a pacients amb RRMS la freqüència de cèl·lules iNKT-CD4⁺ i iNKT-DN està alterada respecte la d'individus sans. Aquest fet, es podria relacionar amb la fase de la malaltia (relapsing o remitting) o bé amb els diferents requeriments homeostàtic de cada un dels subgrups de cèl·lules iNKT. Per tant, per continuar amb aquest treball, a part d'augmentar el número de mostres d'individus sans i de pacients amb RRMS per analitzar, també s'ha proposat l'anàlisi dels TRECs (T-cell receptor excision circles) de cèl·lules iNKT-CD4⁺ i iNKT-DN per a determinar l'efecte del timus en l'homeòstasi d'aquestes dues subpoblacions, a pacients amb RRMS.

A més a més, s'ha iniciat l'estudi de l'expressió del receptors IL7R i IL15R a les diferents subpoblacions de cèl·lules iNKT de pacients amb RRMS i de donants sans, per veure l'efecte de les citocines sobre la homeòstasi dels diferents subgrups de cèl·lules iNKT. A part de tot això, també s'analitzaran les diferents citocines secretades per cada subgrup cel·lulars per a determinar possibles diferències entre pacients i controls.

A1.7. Conclusions

1- Les dades obtingudes per PCR suggereixen la presència de cèl·lules iNKT a CSF de pacients amb RRMS, però no a les lesions cerebrals del mateix pacient. L'expressió de CD1d va ser detectada a una de les lesions cerebrals de la pacient amb RRMS però no es va detectar expressió de CD1a, CD1b ni CD1c a cap de les mostres analitzades.

2- Tal i com ja havia estat descrit prèviament, la freqüència de cèl·lules iNKT a PBMCs de pacients amb RRMS va ser més baixa que a donants sans (HD).

3- La freqüència de cèl·lules iNKT-CD4⁺ i iNKT-DN va ser més baixa a pacients amb RRMS que a controls sans, mostrant diferències estadísticament significatives ($p=0,039$) a nivell de la població de iNKT-CD4⁺. No es van observar diferències en la freqüència de cèl·lules iNKT-CD8 β ⁺ entre controls i pacients.

4- La disminució en la freqüència de cèl·lules iNKT-CD4⁺ va correlacionar amb l'edat dels pacients amb RRMS, a més edat menys quantitat de cèl·lules iNKT-CD4⁺. Aquesta correlació no s'observà a controls sans.

5- La freqüència de cèl·lules iNKT-CD4⁺ va tendir a disminuir en els pacients amb RRMS en funció de la severitat de la malaltia (EDSS). Contràriament, les cèl·lules iNKT-CD8 β ⁺ i iNKT-DN no es van veure afectades.

-
- ¹ Sospedra, M and R, Martin. Immunology of múltiple sclerosis. *Annu.Rev. Immunol.* 2005; 23: 683-747.
- ² Oksenberg JR, Baranzini Se, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet.* 2008; 7: 516-26.
- ³ Granieri E, Casetta I, Tola MR, Ferrante P. Multiple sclerosis: infections hypothesis. *Nuerol Sci.* 2001; 22: 179-85.
- ⁴ Araki M, Kondo T, Gumperz JE, Brenner MB, Miyake S, Yamamura T. Th2 bias of CD4+NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol.* 2003; 15: 279-88.
- ⁵ Mazzanti B, Vergelli M, Riccio P, Martin R, McFarland HF, Liuzzi GM, Amaducci L, Massacesi L.T-cell response to myelin basic protein and lipid-bound myelin basic protein in patients with multiple sclerosis and healthy donors. *J. Neuroimmunol.* 1998; 82: 96-100.
- ⁶ Ilyas AA, Chen ZW, Cook SD. Antibodies to sulfatide in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 2003; 139:76-80.
- ⁷ Pender MP, Csurhes PA, Wolfe NP, Hooper KD, Good MF, McCombe PA, Greer JM. Increased circulating T cell reactivity to GM3 and GQ1b gangliosides in primary progressive multiple sclerosis, *J. Clin, Neurosci,* 2003; 10:63-6
- ⁸ Uhlig H, Dernick R. Monoclonal autoantibodies derived from multiple sclerosis patients and control persons and their reactivities with antigens of the central nervous System. *Autoimmunity.* 1989; 5:87-99.
- ⁹ Shamshiev A, Donda A, Carena I, Mori L, Kappos L, De Libero G. Self glycolipids as T-cell autoantigens. *Eur. J.Immunol.* 1999; 29:1667-75.
- ¹⁰ Sadatipour BT, Greer JM, Pender MP. Increased circulating antiganglioside antibodies in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 1998; 44: 980-3.
- ¹¹ Kanter JL, Narayana S, Ho PP, Catz I, Warren KG, Sobel RA, Steinman L, Robinson WH. Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation *Nat Med.* 2006; 12:138-43.
- ¹² Brigl M, Brenner MB. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22:817-90
- ¹³ Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25:297-336.

-
- ¹⁴ Shamshiev A, Gober HJ, Donda A, Mazorra Z, Mori L, De Libero G. Presentation of the Same Glycolipid by Different CD1 Molecules. *J Exp Med*. 2002; 195:1013-21.
- ¹⁵ Cox D, Fox L, Tian R, Bardet W, Skaley M, Mojsilovic D, Gumperz J, Hildebrand W. Determination of Cellular Lipids Bound to Human CD1d Molecules. *Plos One*. 2009; 4: e5325.
- ¹⁶ Haig NA, Guan Z, Li D, McMichael A, Raetz CR, Xu XN. Identification of Self-lipids Presented by CD1c and CD1d Proteins. *J. Biol. Chem*. 2011; 286:37692-701.
- ¹⁷ Illés Z, Kondo T, Newcombe J, Oka N, Tabira T, Yamamura T. Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol*. 2000; 164:4375-81.
- ¹⁸ van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Nishi N, Reijm M, Voskuyl AE, van Bodegraven AA, Polman CH, Rustemeyer T, Lips P, van den Eertwegh AJ, Giaccone G, Scheper RJ, Pinedo HM. Circulating V α 24+V β 11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. *Clin. Immunol*. 2001; 100:144-8.
- ¹⁹ Araki M, Kondo T, Gumperz JE, Brenner MB, Miyake S, Yamamura T. Th2 bias of CD4+ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol*, 2003; 15: 279-88.
- ²⁰ Illés Z, Kondo T, Newcombe J, Oka N, Tabira T, Yamamura T. Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol*, 2000; 164:4375-81.
- ²¹ Jing Y, Gravenstein S, Chaganty NR, Chen N, Lyerly KH, Joyce S, Deng Y. Aging is associated with a rapid decline in frequency, alterations in subset composition, and enhanced Th2 response in CD1d-restricted NKT cells from human peripheral blood, 2007; 42:719-32.
- ²² Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS), *Neurology*, 1983; 33: 1444-52.
- ²³ Podbielska M, Hogan EL. Molecular and immunogenic features of myelin lipids: incitants or modulators of multiple sclerosis? *Mult Scler*, 2009; 15: 1011-29.
- ²⁴ Shamshiev A, Donda A, Carena I, Mori L, Kappos L, De Libero G. Self glycolipids as T-cell autoantigens. 1999; 29:1667-75
- ²⁵ Shamshiev A, Donda A, Prigozy TI, Mori L, Chigorno V, Benedict CA, Kappos L, Sonnino S, Kronenberg M, De Libero G. The alphabeta T cell response to self-glycolipids shows a novel mechanism of CD1b loading and a requirement for complex oligosaccharides. *Immunity*. 2000; 13:255-64.

-
- ²⁶ Shamshiev A, Gober HJ, Donda A, Mazorra Z, Mori L, De Libero G. Presentation of the same glycolipid by different CD1 molecules. *J Exp Med.* 2002; 195:1013-21.
- ²⁷ Im JS, Tapinos N, Chae GT, Illarionov PA, Besra GS, DeVries GH, Modlin RL, Sieling PA, Rambukkana A, Porcelli SA. Expression of CD1d molecules by human schwann cells and potential interactions with immunoregulatory invariant NK T cells. *J Immunol.* 2006; 177: 5226-35.
- ²⁸ Battistini L, Fischer FR, Raine CS, Brosnan CF. CD1b is expressed in multiple sclerosis lesions, *J Neuroimmunol.* 1996; 67:145-51.
- ²⁹ Illés Z, Kondo T, Newcombe J, Oka N, Tabira T, Yamamura T. Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, *J Immunol.* 2000;164: 4375-81.
- ³⁰ Gausling R, Trollmo C, Hafler DA. Decreases in interleukin-4 secretion by invariant CD4(-)CD8(-)V alpha 24J alpha Q T cells in peripheral blood of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. . 2001; 98 :11-7.
- ³¹ van der Vliet HJ, von Blomberg BM, Nishi N, Reijm M, Voskuyl AE, van Bodegraven AA, Polman CH, Rustemeyer T, Lips P, van den Eertwegh AJ, Giaccone G, Scheper RJ, Pinedo HM. Circulating V(alpha24+) Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. *Clin Immunol,* 2001; 100: 144-8.
- ³² Illés Z, Kondo T, Newcombe J, Oka N, Tabira T, Yamamura T. Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol.* 2000; 15, 164:4375-81.
- ³³ Araki M, Kondo T, Gumperz JE, Brenner MB, Miyake S, Yamamura T. Th2 bias of CD4+ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol.* 2003; 15: 279-88.
- ³⁴ O'Keefe J, Gately CM, Counihan T, Hennessy M, Leahy T, Moran AP, Hogan EL. T-cells expressing natural killer (NK) receptors are altered in multiple sclerosis and responses to alpha-galactosylceramide are impaired. *J Neurol Sci.* 2008; 275: 22-8.
- ³⁵ Furlan R, Bergami A, Cantarella D, Brambilla E, Taniguchi M, Dellabona P, Casorati G, Martino G. Activation of invariant NKT cells by alpha GalCer administration protects mice from MOG35-55-induced EAE: critical roles for administration route and IFN-gamma. *Eur J Immunol.* 2003; 33:1830-8.
- ³⁶ Jing Y, Gravenstein S, Chaganty NR, Chen N, Lyerly KH, Joyce S, Deng Y. Aging is associated with a rapid decline in frequency, alterations in subset composition, and enhanced Th2 response in CD1d-restricted NKT cells from human peripheral blood. . 2007; 42:719-32.

-
- ³⁷ Baev DV, Peng XH, Song L, Barnhart JR, Crooks GM, Weinberg KI, Metelitsa LS. Distinct homeostatic requirements of CD4⁺ and CD4⁻ subsets of Valpha24-invariant natural killer T cells in humans. *Blood*. 2004; 104:4150-6.
- ³⁸ Sandberg JK, Stoddart CA, Brilot F, Jordan KA, Nixon DF. Development of innate CD4⁺ alpha-chain variable gene segment 24 (Valpha24) natural killer T cells in the early human fetal thymus is regulated by IL-7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:7058-63.
- ³⁹ Matsuda JL, Gapin L, Sidobre S, Kieper WC, Tan JT, Ceredig R, Surh CD, Kronenberg M. Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. 2002; 3: 966-74.
- ⁴⁰ Ranson T, Vosshenrich CA, Corcuff E, Richard O, Laloux V, Lehuen A, Di Santo JP. IL-15 availability conditions homeostasis of peripheral natural killer T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:2663-8.
- ⁴¹ Baev DV, Peng XH, Song L, Barnhart JR, Crooks GM, Weinberg KI, Metelitsa LS. Distinct homeostatic requirements of CD4⁺ and CD4⁻ subsets of Valpha24-invariant natural killer T cells in humans. *Blood*. 2004; 104:4150-6.

1. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. Foxp3+ CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2006; 212:8-27.
2. Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol.* 2003; 4: 350-4.
3. Mathis, D., and Benoist, C. Aire. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27: 287-312.
4. Akirav, E.M., Ruddle, N.H., and Herold, K.C. The role of AIRE in human autoimmune disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2011; 7, 25-33.
5. Takaba H, Morishita Y, Tomofuji Y, Danks L, Nitta T, Komatsu N, Kodama T, Takayanagi H. Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-antigen expression for immune Tolerance. *Cell.* 2015; 163:975-87.
6. Simmons KM, Michels AW. Type 1 diabetes: A predictable disease. *World J Diabetes.* 2015; 6:380-90.
7. Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G; EURODIAB Study Group. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. *Lancet.* 2009; 373: 2027-33
8. Komulainen J, Kulmala P, Savola K, Lounamaa R, Ilonen J, Reijonen H, Knip M, Akerblom HK. Clinical, autoimmune, and genetic characteristics of very young children with type 1 diabetes. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Diabetes Care.* 1999; 22:1950-5.
9. Mellerio H, Guilmin-Crépon S, Jacquin P, Labéguerie M, Lévy-Marchal C, Alberti C. Long-term impact of childhood-onset type 1 diabetes on social life, quality of life and sexuality. *Diabetes Metab.* 2015; pii: S1262-3636(15)00002-6.
10. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, Bailey R, Nejentsev S, Field SF, Payne F, Lowe CE, Szeszko JS, Hafler JP, Zeitels L, Yang JH, Vella A, Nutland S, Stevens HE, Schuilenburg H, Coleman G, Maisuria M, Meadows W, Smink LJ, Healy B, Burren OS, Lam AA, Ovington NR, Allen J, Adlem E, Leung HT, Wallace C, Howson JM, Guja C, Ionescu-Tîrgoviște C; Genetics of Type 1 Diabetes in Finland, Simmonds MJ, Heward JM, Gough SC; Wellcome Trust Case Control Consortium, Dunger DB, Wicker LS, Clayton DG. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet.* 2007; 39:857-64.
11. Jahromi MM, Eisenbarth GS. Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. *Cell.Mol.Life Sci.* 2007; 64, 865-872.
12. Hyttinen V, Kaprio J, Kinnunen L, Koskenvuo M, Tuomilehto J. Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. *Diabetes.* 2003; 52:1052-5.

13. Salminen K, Sadeharju K, Lönnrot M, Vähäsalo P, Kupila A, Korhonen S, Ilonen J, Simell O, Knip M, Hyöty H. Enterovirus infections are associated with the induction of beta-cell autoimmunity in a prospective birth cohort study. *J Med Virol.* 2003; 69:91-8.
14. Hiemstra HS, Schloot NC, van Veelen PA, Willemsen SJ, Franken KL, van Rood JJ, de Vries RR, Chaudhuri A, Behan PO, Drijfhout JW et al: Cytomegalovirus in autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:3988-3991.
15. Ou D, Mitchell LA, Metzger DL, Gillam S, Tingle AJ. Cross-reactive rubella virus and glutamic acid decarboxylase (65 and 67) protein determinants recognized by T cells of patients with type I diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2000; 43: 750-762
16. Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvenick N: Diabetes induced by Coxsackie virus: Initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med.* 1998; 4:781-785.
17. Atkinson MA, Bowman MA, Campbell L, Darrow BL, Kaufman DL, Maclaren NK: Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. *The Journal of Clinical Investigation.* 1994; 94: 2125-2129.
18. Martinic MM, Huber C, Coppieters K, Oldham JE, Gavin AL, von Herrath MG: Expression level of a pancreatic neo-antigen in beta cells determines degree of diabetes pathogenesis. *Journal of autoimmunity.* 2010; 35:404-413.
19. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell.* 1995, 80:695-705
20. Kammer AR, van der Burg SH, Grabscheid B, Hunziker IP, Kwappenberg KM, Reichen J, Melief CJ, Cerny A: Molecular mimicry of human cytochrome P450 by hepatitis C virus at the level of cytotoxic T cell recognition. *The Journal of experimental medicine.* 1999; 190:169-176.
21. Varela-Calvino R1, Ellis R, Sgarbi G, Dayan CM, Peakman M. Characterization of the T-cell response to coxsackievirus B4: evidence that effector memory cells predominate in patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2002; 51:1745-53.
22. Huang X, Yuang J, Goddard A et al. Interferon expression in the pancreases of patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 1995; 44:658-64.
23. Rani PS, Doddam SN, Agrawal S, Hasnain SE, Sechi LA, Kumar A, Ahmed N. Specific immunoassays confirm association of *Mycobacterium avium* Subs. *Paratuberculosis* with type-1 but not type-2 diabetes mellitus. *Int J Med Microbiol.* 2014; 304:620-5.
24. Weir GC, Bonner-Weir S. Islets of Langerhans: Islets of Langerhans: the puzzle of intra-islet interactions and their relevance to diabetes. *J Clin Invest.* 1990; 85:983-7.
25. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 2334-9.

26. Gromada J, Franklin I, Wollheim CB: Alpha-cells of the endocrine pancreas: 35 years of research but the enigma remains. *Endocrine reviews*. 2007; 28:84-116.
27. In't Veld P, Marichel M. Microscopic anatomy of the human islet of Langerhans. The islet of Langerhans. *Adv Exp Med Biol*. 2010; 654: 1-19.
28. Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23:447-85.
29. Naumov YN, Bahjat KS, Gausling R, Abraham R, Exley MA, Koezuka Y, Balk SB, Strominger JL, Clare-Salzer M, Wilson SB. Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:13838-43.
30. Wang B, Geng YB, Wang CR. CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes. *J Exp Med*. 2001; 194:313-20.
31. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*. 2000; 12:431-40.
32. Baxter AG, Cooke A. Complement lytic activity has no role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 1993; 42:1574-8.
33. Di Lorenzo TP, Peakman M, Roep BO. Systematic analysis of T cell epitopes in autoimmune diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2007; 148:1-16.
34. Winer S, Tsui H, Lau et al. Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. *Nat Med*. 2003; 9: 198-205.
35. Peter In't Veld. Insulinitis in human type 1 diabetes: a comparison between patients and animal models. *Semin Immunopathol*. 2014; 36: 569-579
36. Alanentalo T, Hörnblad A, Mayans S, Karin Nilsson A, Sharpe J, Larefalk A, Ahlgren U, Holmberg D. Quantification and three-dimensional imaging of the insulinitis-induced destruction of beta cells in murine type 1 diabetes. *Diabetes*. 2010; 59: 1756-1764.
37. Carrero JA, Calderon B, Towfic F, Artyomov MN, Unanue ER. Defining the transcriptional and cellular landscape of type 1 diabetes in the NOD mouse. *Plos ONE*. 2013; 8:e59701.
38. Cardell SL. The natural killer T lymphocyte: a player in the complex regulation of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Clin Exp Immunol*. 2006; 143:194-202.
39. Kodama S, Kühtreiber W, Fujimura S, Dale EA, Faustman DL. Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD Mice. *Science*. 2003; 302:1223-7.
40. Matthias von Herrath, Scrinath Sanda and Kevan Herold. Type 1 diabetes as a relapsing-remitting disease? *Nat Rev Immunol*. 2007; 7: 988-94.

41. Orban T, Sosenko JM, Cuthbertson D, Krischer JP, Skyler JS, Jackson R, Yu L, Palmer JP, Schatz D, Eisenbarth G; Diabetes Prevention Trial-Type 1 Study Group. Pancreatic islet autoantibodies as predictors of type 1 diabetes in the Diabetes Prevention Trial-Type 1. *Diabetes Care*. 2009; 32:2269-74.
42. Krischer JP, Cuthbertson DD, Yu L, Orban T, Maclaren N, Jackson R, Winter WE, Schatz DA, Palmer JP, Eisenbarth GS. Screening strategies for the identification of multiple antibody-positive relatives of individuals with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88:103-8.
43. Meier JJ, Bhushan A, Butler AE, Rizza RA, Butler PC. Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration?. *Diabetologia*. 2005; 48:2221-8.
44. Gepts W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*. 1965; 14:619-633.
45. Klöppel G, Drenck CR, Oberholzer M, Heitz PU. Morphometric evidence for a striking B-cell reduction at the clinical onset of type 1 diabetes. *Virchows Arch*. 1984; 403: 441-452.
46. Lernmark A, Klöppel G, Stenger D, Vathanaprida C, Fält K, Landin-Olsson M, Baskin DG, Palmer JP, Gown AM, Petersen JS, et al. Heterogeneity of islet pathology in two infants with recent onset diabetes mellitus. *Virchows Arch*. 1995; 425: 61-640.
47. Noel G, Morgan, Pia Leete, Alan K. Foulis, Sarah J. Richardson. Islet Inflammation in Human Type 1 Diabetes Mellitus. *IUBMB Life*. 2014; 66:723-34.
48. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan. NG. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2008; 155: 173-81.
49. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med*. 1986; 314:1360-8.
50. Liblau RS, Wong FS, Mars LT, Santamaria P. Autoreactive CD8T cells in organ-specific autoimmunity: emerging targets for therapeutic intervention. *Immunity*. 2002; 17:1-6.
51. Kent SC, Chen Y, Bregoli L, Clemmings SM, Kenyon NS, Ricordi C, Hering BJ, Hafler DA. Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. *Nature*. 2005;435:224-8.
52. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*. 1974; 2:1279-83.
53. Atkinson MA, Maclaren NK. Islets cell autoantigens in insulin dependent diabetes. *J Clin Invest*. 1993; 92:1608-16.
54. Tsirogianni A, Pipi E, Soufleros K. Specificity of islet cell autoantibodies and coexistence with other organ specific autoantibodies in type 1 diabetes mellitus. *Autoimmun Rev*. 2009; 8:687-91.
55. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW, Hutton JC. The cation efflux transportar ZnT8 /slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:17040-5.

56. Moody DB and Porcelli SA. Intracellular pathways of CD1 antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*. 2002; 3: 11-22.
57. Brigl M and Brenner MB. CD1: Antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22:817-90.
58. Borg NA, Wun KS, Kjer-Nielsen L, Wilce M, Pellicci DG, Koh R, Besra GS, Bharadwaj M, Godfrey DI, McCluskey J, Rossjohn J. CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor. *Nature*. 2007; 448: 44.
59. Kain L, Webb B, Anderson BL, Deng S, Holt M, Costanzo A, Zhao M, Self K, Teyton A, Everett C, Kronenberg M, Zajonc DM, Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The identification of the endogenous ligands of natural killer T cells reveals the presence of mammalian α -linked glycosylceramides. *Immunity*. 2014; 41:543-54.
60. Speak AO, Salio M, Neville DC, Fontaine J, Priestman DA, Platt N, Heare T, Butters TD, Dwek RA, Trottein F, Exley MA, Cerundolo V, Platt FM. Implications for invariant natural killer T cell ligands due to the restricted presence of isoglobotrihexosylceramide in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:5971-6.
61. Christiansen D, Milland J, Mouhtouris E, Vaughan H, Pellicci DG, McConville MJ, Godfrey DI, Sandrin MS. Humans lack iGb3 due to absence of functional iGb3-synthase: implications for NKT cell development and transplantation. *PLoS Biol*. 2008; 6:e172.
62. Brennan PJ, Tatituri RV, Brigl M, Kim EY, Tuli A, Sanderson JP, Gadola SD, Hsu FF, Besra GS, Brenner MB. Invariant Natural Killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. *Nat Immunol*. 2011;12:1202-11.
63. Fox LM, Cox DG, Lockridge JL, Wang X, Chen X, Scharf L, Trott DL, Ndonye RM, Veerapen N, Besra GS, Howell AR, Cook ME, Adams EJ, Hildebrand WH, Gumperz JE. Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes. *PLoS Biol*. 2009; 7:e1000228.
64. Roura-Mir C, Moody DB. Sorting out self and microbial lipid antigens for CD1. *Microbes and Infection*. 2003; 5:1137-48.
65. Roura-Mir C, Wang L, Cheng TY, Matsunaga I, Dascher CC, Peng SL, Fenton MJ, Kirschning C, Moody DB. *Mycobacterium tuberculosis* regulates CD1 antigen presentation pathways through TLR2. *J Immunol*. 2005; 175: 1758.
66. Bendelac A, Paul B.S and Luc T. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007; 25:297-336.
67. Chang HK, Butcher E, Johnston B. Distinct subsets of human $V\alpha 24$ -invariant NKT cells: cytokine responses and chemokine receptor expression. *Trends Immunol*. 2002; 23:516-9.
68. Taniguchi M, Harada M, Kojo S, Nakayama T, Wakao H. The regulatory role of $V\alpha 14$ NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:483-513.
69. Seino K and Taniguchi M. Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes. *J Exp Med*. 2005; 202:1623-6.
70. Lin H, Nieda M, Hutton JF, Rozenkov V, Nicol AJ. Comparative gene expression analysis of NKT cell subpopulations. *J Leukoc Biol*. 2006; 80:164-73.

71. East JE, Kennedy AJ, Webb TJ. Raising the roof: the preferential pharmacological stimulation of Th1 and Th2 responses mediated by NKT cells. *Med Res Rev.* 2014; 34:45-76.
72. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13:101-17.
73. Salio M, Silk JD, Jones EY, Cerundolo V. Biology of CD1- and MR1-restricted T cells *Annu Rev Immunol.* 2014; 32:323-66.
74. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today.* 2000; 21: 573-83.
75. Cowan JE, Jenkinson WE, Anderson G. Thymus medulla fosters generation of natural Treg cells, invariant $\gamma\delta$ T cells, and invariant NKT cells: what we learn from intrathymic migration. *Eur J Immunol.* 2015; 45:652-60.
76. Slaunwhite D, Johnston B. Regulation of NKT cells localization in homeostasis and infection. *Front Immunol.* 2015; 27: 6-255.
77. Akbari O, Stock P, Meyer EH, Freeman GJ, Sharpe AH, Umetsu DT, DeKruyff RH. ICOS/ICOSL Interactio Is Required for CD4+ Invariant NKT Cell Function and Homeostatic Survival. *J. Immunol.* 2008; 180: 5448-5456.
78. Zheng J, Chan PL, Liu Y, Qin G, Xiang Z, Lam KT, Lewis DB, Lau YL, Tu W. ICOS Regulates the Generation and Function of Human CD4+ Treg in a CTLA-4 Dependent Manner. *Plos One.* 2013; 8, e82203.
79. Baev DV, Peng XH, Song L, Barnhart JR, Crooks GM, Weinberg KI, Metelitsa LS. Distinct homeostatic requirements of CD4+ and CD4- subsets of Va24-invariant natural killer T cells in humans. *Blood.* 2004; 104:4150-6.
80. Simoni Y, Diana J, Ghazarian L, Beaudoin L, Lehuen A. Therapeutic manipulation of natural killer (NK) T cells in autoimmunity: are we close to reality? *Clin Exp Immunol.* 2013; 171:8-19.
81. Lehuen A, Lantz O, Beaudoin L, Laloux V, Carnaud C, Bendelac, Bach JF, Monteiro RC. Overexpression of natural killer T cells protects V α 24-J α 281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J Exp Med.* 1998; 188:1831-9.
82. Watanabe M, Nakamura Y, Matsuzuka F, Takamura T, Miyauchi A, Iwatani Y. Decrease of intrathyroidal CD161+V α 24+V β 11. *Endocr J.* 2008; 55:199-203.
83. Yoshimoto T, Bendelac A, Hu-Li J, Paul WE. Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4+, NK1.1+ T cells that promptly produce interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 11931-4.
84. Illés Z, Kondo T, Newcombe J, Oka N, Tabira T, Yamamura T. Differential expression of NK T cell V alpha 24 J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol.* 2000; 164:4375-81.

85. Démoulin T, Gachelin G, Bequet D, Dormont D. A biased V α 24⁺ T-cell repertoire leads to circulating NKT-cell defects in a multiple sclerosis patient at the onset of his disease. *Immunol Lett.* 2003; 90:223-8.
86. Maeda T, Keino H, Asahara H, Taniguchi M, Nishioka K, Sumida T. Decreased TCR AV24AJ18⁺ double negative T cells in rheumatoid synovium. *Rheumatology (Oxford)*. 1999; 38:186-8.
87. Shi FD, Flodstrom M, Balasa B, Kim SH, Van Gunst K, Strominger JL, Wilson SB, Sarvetnick N. Germ line deletion of the CD1 locus exacerbates diabetes in the NOD mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001; 98: 6777-6782.
88. Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, Mi QS, Sondhi J, Naidenko OV, Kronenberg M, Koezuka Y, Delovitch TL, Gombert JM, Leite-De-Moraes M, Gouarin C, Zhu R, Hameg A, Nakayama T, Taniguchi M, Lepault F, Lehuen A, Bach JF, Herbelin A. Activation of natural killer T cells by α -galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat. Med.* 2001; 7: 1057-1062.
89. Hong S, Wilson MT, Serizawa I, Wu L, Singh N, Naidenko OV, Miura T, Haba T, Scherer DC, Wei J, Kronenberg M, Koezuka Y, Van Kaer L. The natural killer T-cell ligand α -galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat. Med.* 2001; 7: 1057-1056.
90. Sonoda KH, Faunce DE, Taniguchi M, Exley M, Balk S, Stein-Streilein J. NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. 2001; 166: 42-50.
91. Faunce DE, Stein-Streilein J. NKT cell-derived RANTES recruits APCs and CD8⁺ T cells to the spleen during the generation of regulatory T cells in tolerance. *J. Immunol*, 2002, 169: 31-38.
92. Mizuno M, Masumura M, Tomi C, Chiba A, Oki S, Yamamura T, Miyake S: Synthetic glycolipid OCH prevents insulinitis and diabetes in NOD mice. *J Autoimmun.* 2004; 23:293-300.
93. Oki S, Chiba A, Yamamura T, Miyake S. The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL4-production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. *J.Clin.Invest.* 2004; 113: 1631-1640.
94. Mizuno M, Masumura M, Tomi C, Chiba A, Oki S, Yamamura T, Miyake S. Synthetic glycolipid OCH prevents insulinitis and diabetes in NOD mice. *J. Autoimmun.* 2004; 23: 293-300.
95. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S, Maclaren N. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J. Clin. Invest.* 2002; 109: 131-140.
96. Larkin J 3rd, Rankin AL, Picca CC, Riley MP, Jenks SA, Sant AJ, Caton AJ. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell repertoire formation shaped by differential presentation of peptides from a self-antigen. *J Immunol.* 2008; 180: 2149-57.
97. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003; 4:330-6.
98. Fehérvari Z and Sakaguchi S. Development and function of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol.* 2004; 16:203-8.

99. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med.* 2006; 203:1693-700.
100. Wing K, Ekmark A, Karlsson H, Rudin A, Suri-Payer E. Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology.* 2002; 106:190-9.
101. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol.Rev.* 2001, 182:68-79.
102. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev.* 2001; 182:207–214.
103. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, Schlawe K, Chang HD, Bopp T, Schmitt E, Klein-Hessling S, Serfling E, Hamann A, Huehn J. Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS Biol.* 2007; 5:e38.
104. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nature Rev Immunol.* 2008; 8:523–532.
105. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, Mathian A, Nakahata T, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, Amoura Z, Gorochoy G, Sakaguchi S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 2009; 30:899–911.
106. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nature Rev Immunol.* 2010; 10:490–500.
107. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE, Belkaid Y, Shevach EM. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol.* 2010; 184:3433–3441.
108. Nunes-Cabaço H, Caramalho I, Sepúlveda N, Sousa AE. Differentiation of human thymic regulatory T cells at the double positive stage. *Eur. J Immunol.* 2001; 41:3604-3614.
109. Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Francalanci M, Angeli R, Mazzinghi B, Santarlasci V, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood.* 2003; 102: 4107-14.
110. Fehérvári Z and Sakaguchi S. Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol.* 2004; 16:203-8.
111. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25 (+) CD4 (+) regulatory T cells by interleukin IL2 and induction of autoimmune disease by IL2 neutralization. *J.Exp. Med.* 2005; 201:723-735.
112. Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK, Tooley AJ, Ye J, Subudhi SK, Zheng XX, Strom TB, Bluestone JA. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+regulatory T cells. *J.Immunol.* 2003; 171:3348-3352.

113. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypic and functional specialization of Foxp3+ Regulatory T cells. *Natu Rev Immunol*. 2011; 11: 119-130.
114. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Gene*. 2001; 27: 68-73.
115. Bennett CL, Ochs HD. IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of autoimmune phenomena. *Curr Opin Pediatr*. 2001; 13: 533-8.
116. Sgourudis E, Piccirillo CA. Control of type 1 diabetes by CD4+Foxp3+ regulatory T cells: lessons from mouse models and implications for human disease. *Diabetes*. 2009; 25: 208-18
117. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BA, Peakman M, Tree TIM. Defective Suppressor Function in CD4+ CD25+ T-Cells From Patients with Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2005; 54:92-9.
118. Lawson JM, Tremble J, Dayan CM, Beyan H, Lesli RDG, Peakman M, Tree TIM. Increased resistance to CD4+CD25hi regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2008; 154:353-9.
119. Scheneider A, Rieck M, Sanda S, Pihoker C, Greenbaum C, Buckner JH. The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4+ Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2008; 181:7350-5.
120. Coquet JM, Chakravarti S, Kyparissoudis K, McNab FW, Pitt LA, McKenzie BS, Berzins SP, Smyth MJ, Godfrey DI. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:11287-92.
121. Pandiyan P, Zhu J. Origin and functions of pro-inflammatory cytokine producing Foxp3+ regulatory T cells. *Cytokine*. 2015; 76:13-24.
122. Wahl SM. Transforming growth factor-beta: innately bipolar. *Curr Opin Immunol*. 2007;19:55-62.
123. Bao K, Reinhardt RL. The differential expression of IL-4 and IL-13 and its impact on type-2 immunity. *Cytokine*. 2015; 75:25-37.
124. Andrews AL, Holloway JW, Puddicombe SM, Holgate ST, Davies DE. Kinetic analysis of the interleukin-13 receptor complex. *J Biol Chem*, 2002; 277:46073-8
125. Mannon P, Reinisch W. Interleukin 13 and its role in gut defense and inflammation. *Gut*, 2012; 61:1765-73.
126. Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A. IL-13 signaling through the IL-13 α 2 receptor is involved in induction of TGF- β 1 production and fibrosis. *Nature Medicine*, 2006; 12: 99-106

127. Andrews AL, Nordgren IK, Kirby I, Holloway JW, Holgate ST, Davies DE, Tavassoli A. Cytoplasmic tail of IL-13R α 2 regulates IL-4 signal transduction. *Biochem Soc Trans*, 2009; 37:873-6
128. Kasaian MT, Raible D, Marquette K, Cook TA, Zhou S, Tan XY, Tchistiakova L. IL-13 antibodies influence IL-13 clearance in humans by modulating scavenger activity of IL-13R α 2. *J Immunol*, 2011; 187:561-9
129. Giaccone G, Punt CJ, Ando Y, Ruijter R, Nishi N, Peters M, von Blomberg BM, Scheper RJ, van der Vliet HJ, van den Eertwegh AJ, Roelvink M, Beijnen J, Zwierzina H, Pinedo HM. A phase I study of the natural killer T-cell ligand α -galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 3702-9.
130. Nieda M, Okai M, Tazbirkova A, Lin H, Yamaura A, Ide K, Abraham R, Juji T, Macfarlane DJ, Nicol AJ. Therapeutic activation of V α 24+V β 11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood*. 2004; 103: 383-89.
131. Mars LT, Novak J, Liblau RS, Lehuen A. Therapeutic manipulation of iNKT cells in autoimmunity: Modes of action and potential risks *Trend Immunol*, 2004, 25, 471-476
132. McCarthy C, Shepherd D, Fleire S, Stronge VS, Koch M, Illarionov PA, Bossi G, Salio M, Denkberg G, Reddington F, Tarlton A, Reddy BG, Schmidt RR, Reiter Y, Griffiths GM, van der Merwe PA, Besra GS, Jones EY, Batista FD, Cerundolo V. The length of lipids bound to human CD1d molecules modulates the affinity of NKT cell TCR and the threshold of NKT cell activation. *J Exp Med*. 2007; 204:1131-44.
133. June CH, Blazar BR. Clinical application of expanded CD4+25+ cells. *Semin Immunol*. 2006; 18:78-88.
134. Golshayan D, Jiang S, Tsang J, Garin MI, Mottet C, Lechler RI. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood*. 2007; 109: 827-37.
135. Sagoo P, Ali N, Garg G, Nestle FO, Lechler RI, Lombardi G. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Sci Transl Med*. 2011; 18: 83ra42.
136. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*. 2009; 30: 626-35.
137. Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Dobyszek A, Grabowska M, Techmanska I, Juscinska J, Wujtewicz MA, Witkowski P, Mlynarski W, Balcerska A, Mysliwska J, Trzonkowski P. Administration of CD4+CD25^{high}CD127^{low} regulatory T cells preserves beta-cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes Care*. 2012; 35: 1817-20.
138. Webster KE, Walters S, Kohler RE, Mrkvan T, Boyman O, Surh CD, Grey ST, Sprent J. In vivo expansion of Treg cells with IL2 mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression. *J Exp Med*. 2009; 206:271-60.

139. Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, Penaranda C, Martínez-Llordella M, Ashby M, Nakayama M, Rosenthal W, Bluestone JA. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 2009; 10:1000-7.
140. Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol.* 2008; 9:239-44.
141. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 2009; 20:636-45.
142. Somoza N, Vargas F, Roura-Mir C, Vives-Pi M, Fernández-Figueras MT, Ariza A, Gomis R, Bragado R, Martí M, Jaraquemada D. 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.* 1994; 153: 1360-77.
143. Planas R, Carrillo J, Sanchez A, de Villa MC, Nuñez F, Verdaguer J, James RF, Pujol-Borrell R, Vives-Pi M. Gene expression profiles for the human pancreas and purified islets in type 1 diabetes: new findings at clinical onset and in long-standing diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2009; 159: 23-44.
144. Genevée C, Diu A, Nierat J, Caignard A, Dietrich PY, Ferradini L, Roman-Roman S, Triebel F, Hercend T. An experimentally validated panel of subfamily-specific oligonucleotide primers (V α 1- α 29/V β 24) for the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction. *Eur J Immunol.* 1992; 22: 1261.
145. De Kleer IM, Wedderburn LR, Taams LS, Patel A, Varsani H, Klein M, De Jager W, Pugayung G, Giannoni F, Rijkers G, Albani S, Kuis W, Prakken B. CD4+ CD25bright Regulatory T Cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic Arthritis. *J Immunol.* 2004; 172: 6435.
146. Masaru Taniguchi et al. The NKT cell System: bridging innate and acquired immunity. *Nature Immunology.* 2003; 4: 1164 – 1165.
147. Stetson DB, Mohrs M, Reinhardt RL, Baron JL, Wang ZE, Gapin L, Kronenberg M, Locksley RM. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NKT cells poised for rapid effector function. *J Exp Med.* 2003; 198: 1069-1076.
148. Beaudoin L, Laloux V, Novak J, Lucas B, Lehuen A. NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells. *Immunity.* 2002, 17:725–36
149. Novak J, Lehuen A. Mechanism of regulation of autoimmunity by iNKT cells. *Cytokine*, 2011; 53:263-70.
150. Magalhaes I, Kiaf B, Lehuen A. iNKT and MAIT Cell Alterations in Diabetes. *Front Immunol.* 2015; 6:341.
151. Simoni Y, Diana J, Ghazarian L, Beaudoin L, Lehuen A. Therapeutic manipulation of natural killer (NK) T cells in autoimmunity: are we close to reality? *Clin Exp Immunol.* 2013; 171:8-19.
152. Hammond KJ, Poulton LD, Palmisano LJ, Silveira PA, Godfrey DI, Baxter AG. alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in

nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med*, 1998; 187:1047-56.

153. Kis J, Engelmann P, Farkas K, Richman G, Eck S, Lolley J, Jalahej H, Borowiec M, Kent SC, Treszl A, Orban T. Reduced CD4⁺ subset and Th1 bias of the human iNKT cells in Type 1 diabetes mellitus. *J Leukoc Biol*. 2007; 81:654-62.

154. Schneider A, Rieck M, Sanda S, Pihoker C, Greenbaum C, Buckner JH. The Effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4⁺FOXP3⁺ regulatory T Cells. *J Immunol*, 2008; 181: 7350-55.

155. Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM. IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4⁺ CD25⁺ T Cell suppressor function. *J Immunol*, 2004; 172: 6519-23.

156. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International Immunology*, 2009; 21: 1105-111.

157. Rapoport MJ, Mor A, Vardi P, Ramot Y, Winker R, Hindi A, et al. Decreased secretion of Th2 cytokines precedes up-regulated and delayed secretion of Th1 cytokines in activated peripheral blood mononuclear cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Autoimm*, 1998; 11:635-42.

158. Rydén A, Faresjo M. Altered immune profile from pre-diabetes to manifestation of type 1 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*, 2013; 100:74-84.

159. Bugawan TL, Mirel DB, Valdes AM, Panelo A, Pozzilli P, Erlich HA. Association and interaction of the IL4R, IL4, and IL13 loci with type 1 diabetes among Filipinos. *Am J Hum Genet*. 2003; 72:1505-14.

160. Steck AK, Bugawan TL, Valdes AM, Emery LM, Blair A, Norris JM, Redondo MJ, Babu SR, Erlich HA, Eisenbarth GS, Rewers MJ. Association of non-HLA genes with type 1 diabetes autoimmunity. *Diabetes*. 2005; 54:2482-6.

161. McKenzie GJ, Emson CL, Bell SE, Anderson S, Fallon P, Zurawski G, Murray R, Grecis R, McKenzie AN. Impaired Development of Th2 Cells in IL-13-Deficient Mice. *Immunity*. 1998; 9:423-32.

162. Bost KL, Holton RH, Cain TK, Clements JD. In vivo treatment with anti-interleukin-13 antibodies significantly reduces the humoral immune response against an oral immunogen in mice. *Immunology*. 1996; 87:633-41.

163. Cihakova D, Barin JG, Afanasyeva M, Kimura M, Fairweather D, Berg M, Talor MV, Baldeviano GC, Frisancho S, Gabrielson K, Bedja D, Rose NR. Interleukin-13 protects against experimental autoimmune myocarditis by regulating macrophage differentiation. *Am J Pathol*. 2008; 172:1195-208.

164. Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol*, 2005; 23:877-900.

165. Blumenfeld HJ, Tohn R, Haeryfar SM, Liu Y, Savage PB, Delovitch TL. Structure-guided design of an invariant natural killer T cell agonist for optimum protection from type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Clin Exp Immunol*. 2011; 166:121-33.

166. Yu KO, Im JS, Molano A, Dutronc Y, Illarionov PA, Forestier C, Fujiwara N, Arias I, Miyake S, Yamamura T, Chang YT, Besra GS, Porcelli SA. Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of α -galactosylceramides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:3383-8.
167. Kinjo Y, Tupin E, Wu D, Fujio M, Garcia-Navarro R, Benhnia MR, Zajonc DM, Ben-Menachem G, Ainge GD, Painter GF, Khurana A, Hoebe K, Behar SM, Beutler B, Wilson IA, Tsuji M, Sellati TJ, Wong CH, Kronenberg M. Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol*. 2006; 7:978-86.
168. Sakuishi K, Oki S, Araki M, Porcelli SA, Miyake S, Yamamura T. Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation. *J Immunol*. 2007; 179:3452-62.
169. Matsuda, J. L., L. Gapin, J. L. Baron, S. Sidobre, D. B. Stetson, M. Mohrs, R. M. Locksley, and M. Kronenberg. 2003. Mouse V 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:8395-400
170. Rapoport MJ, Mor A, Vardi P, Ramot Y, Winker R, Hindi A, et al. Decreased secretion of Th2 cytokines precedes up-regulated and delayed secretion of Th1 cytokines in activated peripheral blood mononuclear cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Autoimm*, 1998; 11:635-42
171. Zhou RW, Mkhikian H, Grigorian A, Hong A, Chen D, Arakelyan A, Demetriou M. N-glycosylation bidirectionally extends the boundaries of thymocyte positive selection by decoupling Lck from Ca²⁺ signaling. *Nature Immunology*, 2014; 15:1038-46.
172. Lee SU, Grigorian A, Pawling J, Chen IJ, Gao G, Mozaffar T, McKerlie C, Demetriou M. N-Glycan Processing Deficiency Promotes Spontaneous Inflammatory Demyelination and Neurodegeneration. *J Biol Chem*, 2007; 282: 33725-34.
173. Grigorian A, Lee SU, Tian W, Chen IJ, Gao G, Mendelsohn R, Dennis JW, Demetriou M. Control of T Cell-mediated Autoimmunity by Metabolite Flux to N-Glycan Biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007; 282:20027-35.
174. Roivainen M, Ylipaasto P, Savolainen C, Galama J, Hovi T, Otonkoski T. Functional impairment and killing of human beta cells by enteroviruses: the capacity is shared by a wide range of serotypes, but the extent is a characteristic of individual virus strains. *Diabetologia*, 2002; 45:693–702.
175. Olsson A, Johansson U, Korsgren O, Frisk G. Inflammatory gene expression in Coxsackievirus B-4-infected human islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; 330:571-6.
176. Alba A, Puertas MC, Carrillo J, Planas R, Ampudia R, Pastor X, Bosch F, Pujol-Borrell R, Verdaguer J, Vives-Pi M. IFN β Accelerates Autoimmune Type 1 Diabetes in Nonobese Diabetic Mice and Breaks the Tolerance to β Cells in Nondiabetes-Prone Mice. *J Immunol*. 2004; 173:6667-75.
177. Kaser A, Molnar C, Tilg H. Differential regulation of interleukin 4 and interleukin 13 production by interferon alpha. *Cytokine*, 1998; 10:75–81.

178. Russell MA, Morgan NG. The impact of anti-inflammatory cytokines on the pancreatic β -cell. *Islets*, 2014; 6:e950547
179. Zaccone P, Phillips J, Conget I, Gomis R, Haskins K, Minty A, Bendtzen K, Cooke A, Nicoletti F. Interleukin-13 Prevents Autoimmune Diabetes in NOD Mice. *Diabetes*, 1999; 48:1522-28.
180. Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C, Donaldson DD, Carbone DP, Paul WE, Berzofsky JA. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol*, 2000; 1:515-20
181. Rasche SS, Phillips M, McInerney MF, Sercarz EE, Quinn A. IL-13R α 1 expression on β -cell-specific T cells in NOD mice. *Diabetes*, 2011; 60:1716-25.
182. Li L, Lee HH, Bell JJ, et al. IL-4 utilizes an alternative receptor to drive apoptosis of Th1 cells and skews neonatal immunity toward Th2. *Immunity*, 2004; 20:429-440.
183. Newcomb DC, Zhou W, Moore ML, et al. A functional IL-13 receptor is expressed on polarized murine CD4+ Th17 cells and IL-13 signaling attenuates Th17 cytokine production. *J Immunol*, 2009; 182:5317-21.
184. Granel B, Allanore Y, Chevillard C, Arnaud V, Marquet S, Weiller PJ, Durand JM, Harlé JR, Grange C, Frances Y, Berbis P, Gaudart J, de Micco P, Kahan A, Dessein A. IL13RA2 gene polymorphisms are associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2006; 33:2015-9.
185. Hershey GK. IL-13 receptor and signaling pathways: An evolving web. *J Allergy Clin Immunol*, 2003; 111: 677-90.
186. Izuhara K, Arima K. Signal transduction of IL-13 and its role in the pathogenesis of bronchial asthma. *Drug News Perspect*, 2004; 17:91-8.
187. Mannon P, Reinisch W. Interleukin 13 and its role in gut defense and inflammation. *Gut*, 2012; 61:1765-73.
188. Ramalingam TR, Pesce JT, Sheikh F, Cheever AW, Mentink-Kane MM, Wilson MS, Stevens S, Valenzuela DM, Murphy AJ, Yancopoulos GD, Urban JF Jr, Donnelly RP, Wynn TA. Unique functions of the type II interleukin 4 receptor identified in mice lacking the interleukin 13 receptor α 1 chain. *Nat Immunol*. 2008; 9:25-33.
189. Wood N, Whitters MJ, Jacobson BA, Witek J, Sypek JP, Kasaian M, Eppihimer MJ, Unger M, Tanaka T, Goldman SJ, Collins M, Donaldson DD, Grusby MJ. Enhanced Interleukin (IL)-13 Responses in Mice Lacking IL-13 Receptor α 2. *J Exp Med*. 2003; 197:703-9.
190. Novak VJ, Beaudoin L, Griseri T, Lehuen A. Inhibition of T Cells differentiation into effectors by NKT cells requires cell contacts. *Journal of Immunology*, 2005; 174: 1954-61.
191. Beaudoin L, Diana J, Ghazarian L, Simoni Y, Boitard C, Lehuen A. Plasmacytoid dendritic cells license regulatory T cells, upon iNKT-cell stimulation, to prevent autoimmune diabetes. *Eur J Immunol*, 2014; 44:1454-66.
192. Araujo LM, Lefort J, Nahori MA, Diem S, Zhu R, Dy M, Leite-de-Moraes MC, Bach JF, Vargaftig BB, Herbelin A. Exacerbated Th2-mediated airway inflammation and

hyperresponsiveness in autoimmune diabetes-prone NOD mice: a critical role for CD1d-dependent NKT cells. *Eur J Immunol*, 2004; 34:327-35.

193. Michalek J, Vrabelova Z, Hrotekova Z, Kyr M, Pejchlova M, Kolouskova S, Faresjö M, Stechova K. Immune regulatory T cells in siblings of children suffering from type 1 diabetes mellitus. *Scand J Immunol*. 2006; 64:531-5.

194. Xufré C, Costa M, Roura-Mir C, Codina-Busqueta E, Usero L, Pizarro E, Obiols G, Jaraquemada D, Martí M. Low frequency of GITR+T cells in ex vivo and in vitro expanded Treg cells from type 1 diabetic patients. *Int Immunol*. 2013; 25:563-74.

195. Jin Y, Chen X, Podolsky R, Hopkins D, Makala LH, Muir A, She JX. APC dysfunction is correlated with defective suppression of T cell proliferation in human type 1 diabetes. *Clin Immunol*. 2009; 130:272-9.

196. Luczynski W, Stasiak-Barmuta A, Urban R, Urban M, Florys B, Hryszko M. Lower percentages of T regulatory cells in children with type 1 diabetes - preliminary report. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab*. 2009; 15:34-8.

197. Ryba M, Hak L, Zorena K, Mysliwiec M, Mysliwska J. Regulatory T lymphocytes expressing L-selectin in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab*. 2010; 16:12-6.

198. Brusko T, Wasserfall C, McGrail K, Schatz R, Viener HL, Schatz D, et al. No alterations in the frequency of FOXP3+ regulatory T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2007; 56:604-12.

199. Putnam AL, Vendrame F, Dotta F, Gottlieb PA. CD4+CD25high regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J Autoimmun*. 2005; 24:55-62.

200. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol*. 2004; 34:2480-8.

201. Scheffold A, Hühn J, Höfer T. Regulation of CD4+CD25+ regulatory T cell activity: it takes (IL-) two to tango. *Eur J Immunol*. 2005; 35:1336-41.

202. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature Immunol*. 2007. 8, 1353-1362.

203. Takeshi Azuma, Tsuyoshi Takahashi, Atsushi Kunisato, Tadaichi Kitamura, and Hisamaru Hirai. Human CD4+CD25+ Regulatory T Cell Suppress NKT Cell Functions. *Cancer Research*. 2003; 63, 4516-4520.

204. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med*. 2013; 19: 355-367.

205. Åkesson K, Tompa A, Rydén A, Faresjö M. Low expression of CD39(+) /CD45RA(+) on regulatory T cells (Treg) cells in type 1 diabetic children in contrast to high expression of CD101(+) /CD129(+) on Treg cells in children with coeliac disease. *Clin Exp Immunol.* 2015; 180:70-82.
206. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Höpner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Röttschke O, Falk K. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* 2007; 110:1225-32.
207. Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, Tubridy N, Mills KH. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2009; 183:7602-10.
208. Michel L, Berthelot L, Pettré S, Wiertlewski S, Lefrère F, Braudeau C, Brouard S, Souillou JP, Laplaud DA. Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor α -chain are excluded from the analysis. *J Clin Invest.* 2008; 118:3411-9.
209. Arif S, Tree TI, Astill TP, Tremble JM, Bishop AJ, Dayan CM, Roep BO, Peakman M. Autoreactive T-cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. *J Clin Invest.* 2004; 113:451-63.
210. Kotani R, Nagata M, Moriyama H, Nakayama M, Yamada K, Chowdhury SA, Chakrabarty S, Jin Z, Yasuda H, Yokono K. Detectin of GAD65-reactive T-cells in type 1 diabetes by immunoglobulin.free ELISPOT assays. *Diabetes Care.* 2002; 25:1390-7.
211. Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, Kitamura T, Hirai H. Human CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress NKT Cell Functions. *Cancer Res.* 2003; 63:4516-20.
212. Hongo D, Tang X, Dutt S, Nador RG, Strober S. Interactions between NKT cells and Tregs are required for tolerance to combined bone marrow and organ transplants. *Blood.* 2012; 119:1581-9.
213. La Cava A, Van Kaer L, Fu-Dong-Shi. CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends Immunol.* 2006; 27:322-7.
214. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998; 188:287-96.
215. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ natural anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 1998; 10:1969-80.
216. Read S, Mauze S, Asseman C, Bean A, Coffman R, Powrie F. CD38+CD45RB (low) CD4+ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities *in vitro*. *Eur J Immunol.* 1998; 28: 3435-47.

217. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2009; 155:173-81
218. Morgan NG, Leete P, Foulis AK, Richardson SJ. Islet inflammation in human type 1 diabetes mellitus. *IUBMB Life.* 2014; 66:723-34
219. Mackay LK, Stock AT, Ma JZ, Jones CM, Kent SJ, Mueller SN, Heath WR, Carbone FR, Gebhardt T. Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U SA.* 2012; 109:7037-7042.
220. Rodriguez-Calvo T, Ekwall O, Amirian N, Zapardiel-Gonzalo J, von Herrath MG. Increased Immune Cell Infiltration of the Exocrine Pancreas: A possible Contribution to the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. *Diabete.* 2014; 63:3880-90.
221. Rothstein DM, Camirand G. New insights into the mechanisms of Treg function. *Curr Opin Organ Transplant.* 2015; 20:376-84.
222. Slauenwhite D, Johnston B. Regulation of NKT Cell Localization in Homeostasis and Infection. *Front Immunol.* 2015; 27: 6-255.
223. Oikawa Y, Shimada A, Yamada S, Motohashi Y, Nakagawa Y, Irie J, Maruyama T, Saruta T. High frequency of $\alpha 24(+)$ $\beta 11(+)$ T-cells observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2002; 25:1818-23.
224. Wilson SB, Kent SC, Patton KT, Orban T, Jackson RA, Exley M, Porcelli S, Schatz DA, Atkinson MA, Balk SP, Strominger JL, Hafler DA. Extreme Th1 bias of invariant $\alpha 24\beta 11$ T cells in type 1 diabetes. *Nature.* 1998; 391:177-81.
225. Nonantzin Beristain-Covarrubias, Elsy Canché-Pool, 3Mayra Vaal-Aguilar, 2Rita Gómez-Díaz, 2 and Vianney Ortiz-Navarrete Low frequency of iNKT cells in Type 1 Diabetes Patients and their first degree relatives: A Mexican Cohort. *The Journal of Immunology.* 2012; 188; 60-9.
226. Kriegel MA, Lohmann T, Gabler C, Blank N, Kalden JR, Lorenz HM. Defective suppressor function of human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J Exp Med.* 2004; 199:1285-91.
227. Marazuela M1, García-López MA, Figueroa-Vega N, de la Fuente H, Alvarado-Sánchez B, Monsiváis-Urenda A, Sánchez-Madrid F, González-Amaro R. Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:3639-46.
228. Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S, Maclaren N. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest.* 2002; 109:131-40.
229. Codina-Busqueta E, Scholz E, Muñoz-Torres PM, Roura-Mir C, Costa M, Xufré C, Planas R, Vives-Pi M, Jaraquemada D, Martí M. TCR bias of in vivo expanded T cells in pancreatic islets and spleen at the onset in human type 1 diabetes. *J Immunol.* 2011; 186:3787-97.

230. Lee YJ, Wang H, Starrett GJ, Phuong V, Jameson SC, Hogquist KA. Tissue-Specific Distribution of iNKT Cells Impacts Their Cytokine Response. *Immunity*. 2015; 43:566-78.
231. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, Koseki H, Taniguchi M. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science*. 1997; 278:1626-9.
232. Chang YJ, Kim HY, Albacker LA, Lee HH, Baumgarth N, Akira S, Savage PB, Endo S, Yamamura T, Maaskant J, Kitano N, Singh A, Bhatt A, Besra GS, van den Elzen P, Appelmelk B, Franck RW, Chen G, DeKruyff RH, Shimamura M, Illarionov P, Umetsu DT. Influenza infection in suckling mice expands an NKT cells subset that protects against airway hyperreactivity. *J Clin Invest*. 2011; 121:57-69.
233. Ito Y, Vela JL, Matsumura F, Hoshino H, Tyznik A, Lee H, Girardi E, Zajonc DM, Liddington R, Kobayashi M, Bao X, Bugaytsova J, Borén T, Jin R, Zong Y, Seeberger PH, Nakayama J, Kronenberg M, Fukuda M. Helicobacter pylory cholesteryl a-glucosides contribute to its pathogenicity and immune response by natural killer T cells. *PLoS One*. 2013; 8:e78191.
234. Rodriguez-Calvo T, Ekwall O, Amirian N, Zapardiel-Gonzalo J, von Herrath MG. Increased Immune Cell Infiltration of the Exocrine Pancreas: A possible Contribution to the Pathogenesis of Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2014; 63:3880-90.
235. Nikolic T, Bouma G, Drexhage HA, Leenen PJ. Diabetes-prone NOD mice show an expanded subpopulation of mature circulating monocytes, which preferentially develop into macrophage-like cells in vitro. *J Leukoc Biol*. 2005, 78:70-79.
236. Calderon B, Suri A, Miller MJ, Unanue ER. Dendritic cells in islets of Langerhans constitutively present beta cell-derived peptides bound to their class II MHC molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:6121-6.
237. Morgan NG, Leete P, Foulis AK, Richardson SJ. Islet Inflammation in Human Type 1 Diabetes Mellitus. *IUBMB Life*. 2014; 66:723-34.
238. Creutzfeldt W, Gleichmann D, Otto J, Stöckmann F, Maisonneuve P, Lankisch PG. Follow-up of exocrine pancreatic functioning type-1 diabetes mellitus. *Digestion*. 2005; 72:71-5.
239. Spencer J, Peakman M. Post-mortem analysis of islet pathology in type 1 diabetes illuminates the life and death of the β cell. *Clin Exp Immunol*. 2008; 155:125-27.
240. Korpos É, Kadri N, Kappelhoff R, Wegner J, Overall CM, Weber E, Holmberg D, Cardell S, Sorokin L. The peri-islet basement membrane, a barrier to infiltrating leukocytes in type 1 diabetes in mouse and human. *Diabetes*. 2013; 62:531-42.
241. Gebhardt T, Mackay LK. Local immunity by tissue-resident CD8(+) memory T cells. *Front Immunol*. 2012, 9; 3:340.
242. Bluestone JA, Bour-Jordan H, Cheng M, Anderson M. T cells in the control of organ-specific autoimmunity. *J Clin Invest*. 2015; 125:2250-60.
243. Campbell-Thompson M, Rodriguez-Calvo T, Battaglia M. Abnormalities of the Exocrine Pancreas in Type 1 Diabetes. *Curr Diab Rep. Curr Diab Rep*. 2015; 15:79.

244. Juno JA, Keynan Y, Fowke KR. Invariant NKT cells: regulation and function during viral infection. *PLoS Pathog.* 2012; 8:e1002838.
245. Tard C, Rouxel O, Lehuen A. Regulatory Role of Natural Killer T Cells in Diabetes. *Biomed J.* 2015; *Biomed J.* 2015 Jun 12. doi: 10.4103/2319-4170.158622.
246. Chang DH, Osman K, Connolly J, Kukreja A, Krasovsky J, Pack M, Hutchinson A, Geller M, Liu N, Annable R, Shay J, Kirchhoff K, Nishi N, Ando Y, Hayashi K, Hassoun H, Steinman RM, Dhodapkar MV. Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of alpha-galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients. *J Exp Med.* 2005; 201:1503-17.
247. Motohashi S, Ishikawa A, Ishikawa E, Otsuji M, Iizasa T, Hanaoka H, Shimizu N, Horiguchi S, Okamoto Y, Fujii S, Taniguchi M, Fujisawa T, Nakayama T. A phase I study of in vitro expanded natural killer T cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12:6079-86.
248. Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature.* 2001; 413:531-4.
249. Schmiege J, Yang G, Franck RW, Tsuji M. Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand alpha-Galactosylceramide. *J Exp Med.* 2003; 198:1631-41.
250. Yang G, Schmiege J, Tsuji M, Franck RW. The C-glycoside analogue of the immunostimulant alpha-galactosylceramide (KRN7000): synthesis and striking enhancement of activity. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2004; 43:3818-22.
251. Berkens CR, Ovaa H. Immunotherapeutic potential for ceramide-based activators of iNKT cells. *Trends Pharmacol Sci.* 2005; 26:252-7.
252. Gapin L. iNKT cell autoreactivity: what is 'self' and how is it recognized?. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10:272-7.
253. Ito Y, Vela JL, Matsumura F, Hoshino H, Tyznik A, Lee H, Girardi E, Zajonc DM, Liddington R, Kobayashi M, Bao X, Bugaytsova J, Borén T, Jin R, Zong Y, Seeberger PH, Nakayama J, Kronenberg M, Fukuda M. *Helicobacter pylori* cholesteryl a-glucosides contribute to its pathogenicity and immune response by natural killer T cells. *PLoS One.* 2013; 8 :e78191.
254. An D, Oh SF, Olszak T, Neves JF, Avci FY, Erturk-Hasdemir D, Lu X, Zeissig S, Blumberg RS5, Kasper DL6. Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells. *Cell.* 2014; 156:123-33.

255. Wieland Brown LC, Penaranda C, Kashyap PC, Williams BB, Clardy J, Kronenberg M, Sonnenburg JL, Comstock LE, Bluestone JA, Fischbach MA. Production of α -galactosylceramide by a prominent member of the human gut microbiota. *PLoS Biol.* 2013; 11:e1001610.
256. June CH, Blazar BR. Clinical application of expanded CD4+25+ cells. *Semin Immunol*, 2006; 18:78-88.
257. Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, Dobyszek A, Krzystyniak A, Marek N, Myśliwska J, Hellmann A. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin Immunol.* 2009; 133:22-6.
258. Golshayan D, Jiang S, Tsang J, Garin MI, Mottet C, Lechler RI. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood*, 2007; 109: 827-37.
259. Riley JL, June CH, Blazar BR. Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity.* 2009; 30:656-65.

Publicacions

Usero L, Codina-Busqueta, E, Costa M, Vives-Pi M, Jaraquemada D, Martí M, Roura-Mir C. Dynamics of the infiltrating iNKT and Treg cells in pancreas from T1D patients at different disease stages. Currently under second revision in Diabetes (manuscript number DB15-1350).

Usero L, Sánchez A, Pizarro E, Xufré C, Martí M, Jaraquemada D, Roura-Mir C. IL-13 pathway alterations impair iNKT cell-mediated regulation of T effector cells in Type 1 Diabetes. Ready to be submitted The Journal of Immunology.

Usero L, Martínez A, Xufré C, Martí M, Jaraquemada D, Roura-Mir C. NKT and Treg cells cooperation to suppress T effector cells in Type 1 Diabetes (Manuscrit en preparació).

Xufré C, Costa M, Roura-Mir C, Codina-Busqueta E, **Usero L**, Pizarro E, Obiols G, Jaraquemada D, Martí M. Low frequency of GITR+ T cells in ex vivo and in vitro expanded Treg cells from type 1 diabetic patients. Int Immunol. 2013; 25:563-74.

Pifarré P, Gutierrez-Mecinas M, Prado J, **Usero L**, Roura-Mir C, Giralt M, Hidalgo J, García A. Phosphodiesterase 5 inhibition at disease onset prevents experimental autoimmune encephalomyelitis progression through immunoregulatory and neuroprotective actions. Exp Neurol. 2014; 251:58-71.



Agraïments

Una vez alguien me dijo “Sólo aquellos que se atreven a tener grandes fracasos terminan consiguiendo grandes éxitos”, supongo que lo debería decir en algún momento de esos en los que nada sale bien, te quieres ir al mercadona/carrefour, whatever, porque piensas que la ciencia no es para ti, que es “too much”, momentos en los que piensas, “hoy salgo de fiestaca y la lio en el pódium” ... en fin... cosas que pasan durante una tesis doctoral, ☺. Ya hace unos 5-6 años que me dieron la oportunidad de crecer como persona, como compañera, como amiga y sobretodo como científica. Pues ha llegado el momento de defenderla con cuchillos, espada y lo que haga falta. Durante estos 5-6 años, he vivido momentos felices, momentos tristes, momentos de pensar “lo dejo todo y me piro”, pero aún después de todo eso, creo que volvería a escoger el mismo camino.

Tengo que reconocer, que todos estos años me han hecho madurar no sólo como persona, si no también como científica. He conocido gente maravillosa dentro y fuera del laboratorio que día a día me han apoyado y han creído en mí. Así que ha llegado el momento de agradecer mucho a mucha gente, así que ahí van mis agradecimientos:

Con todo mi cariño, voy a empezar dedicando esta Tesis a mis padres, quiénes son un gran ejemplo de sacrificio y esfuerzo para mí, quiénes han sabido sacar lo mejor de mí en cada momento de mi vida y quiénes me han dado la fuerza y los consejos necesarios en cada etapa de mi vida.

Gracias Papino (nombre asignado a mi padre desde el día que me rescato de la picadura de una gallina en el zoo de Barcelona cuando era muy pequeña ☺) por tu apoyo, la orientación que me has dado y por darme las pautas necesarias para llegar a ser la persona que soy hoy en día. Te agradezco los consejos sabios que has sabido darme en el momento justo e indicado, por ayudarme a tomar las decisiones que me ayudan a balancear mi vida y sobre todo gracias por todo el cariño que me das. Mami, que te voy a decir yo a ti, eres la persona que siempre me ha levantado los ánimos, tanto en los momentos difíciles de mi vida académica como en la personal. Gracias por tu paciencia y esas palabras sabias que sólo una madre saber dar, gracias por aguantarme en los momentos tristes, felices, “xungos” y gracias por ayudarme a compartir y alcanzar mis sueños con tus consejos, besitos y mimitos.

A mis padres ☺

Que decir de mi maravillosa familia, agradecerles a todos, esos momentos compartidos cada año.. Me encanta cuando me mirábais con cara “póker” cada vez que hablaba de lo bonitas que estaban mis celulitas iNKT, cada fin de semana que iba al laboratorio a verlas. A mi querido primo Juanito, por esas noches alocadas que hemos tenido, ya tu sabes ehh jeje. Y aunque no esten aquí porque hace mucho que se fueron, sé que estarían orgullosos de mi, a vosotros yayos os adoré, os adoro y siempre os adoraré y por eso os dedico esta Tesis.

A mi familia ☺

Agradezco a la Dr. Carme Roura todo su apoyo por guiarme en la dirección correcta y por el buen camino científico. Por darme la oportunidad de trabajar con ella durante el desarrollo del proyecto y de mi Tesis, así como de ser un gran ejemplo para mí a nivel científico (musical no pq jo sóc més del “lolailo” flamenqueo i tu no ☺). Gracias por creer en mí desde el principio, dirigirme y sobretodo por apoyarme y darme ánimos cuando a veces creía que no podía más. Creo que no podría haber tenido mejor investigadora a mi lado.

A Carme Roura 🙌★

Que decir de mi maravilloso grupo de Immunología Cel-lular, gracias a cada uno de vosotros, a los que están y a los que ya han emprendido un nuevo vuelo fuera del IBB. Mi Dolo y mi Merche, dos mujeres que no sólo son buenas científicas, sino marchosas y flamencas, ole ole ole los caracoles, gracias por vuestro apoyo incondicional y por haberme enseñado tanto. Aiii esa Tere chungui... que se hizo doctora hace muy poquito gracias a la virgen de su pollata que por ella “mata” jejeje. Carol, mi beautiful Caroline, por esas charlas via facebook i/o whataap ☺, ya tú sabes. Con Annabel (mi tobbis) y Erika creo que he aprendido mucho sobre niños, que risas nos pegábamos con vuestras historias con los peques. Cristina (la Xufi), que decir de esas conversaciones donde sólo eran testigos tres magníficos, guapos, grandes y trabajadores citómetros... donde nunca se acababan de pasar los 1255 tubos y más. Manuela, la citometrista sexy y guapa, te acuerdas de esos días en los que intentaba enseñarte a bailar en la sala de citometría, mientras los 1255 tubos del CBA se pasaban?, pues aún está pendiente que lo sepas. Javi e Iñaki, uno enseña el culo y el otro cuenta un chiste, tal para cual. Pepi, nuestra niña grande, que divertido era hacer las prácticas juntas con los yogurines, te acuerdas? Hoy te pago yo el café pero mañana tú, vale? “Ok makey”. Franchesca, mi mami del IBB, gracias por esos momentos selfie, de risotadas y por apoyarme en todo, te aprecio muchísimo y lo sabes. Marta y Ana, las niñas master jejeje gracias Marta por esa muchequita flamenca-científica que me relajaste, la llevaré siempre a donde vaya (I promise ☺), Ana, gracias por esos días hasta las 3:00 de la mañana que te quedaste ayudándome y gracias por esos bailes y locuras varias realizadas, ya tú me entiendes ☺. A todas esa nueva generación que va entrando y que se han ido, Carlos, Anna, Laura, Roc, Cristina a trabajar duro que todo se consigue.

A mis compañeros ⚙

No me podía olvidar de dar las gracias a todos mis amigos, gracias a todos por estar ahí, pero en especial gracias a Raúl y Marta, mis mejores amigos desde siempre, por esos viajes a “Chequilla”, esas comidas en el Tagliatella, esos días de patinaje sobre hielo etc.. no se pueden contar la cantidad de momentos que hemos vivido juntos. Ahora os toca a vosotros enseñar al precioso bebé que estáis esperando... un sobrinito para la tita Lorena jejeje, os adoro. Sois los mejores amigos que una puede tener, en las buenas y en las malas. A mi Miguel Carmona, amigos desde el colegio y aunque no te veo porque vivimos lejos sé que estás ahí por tus llamadas y msj, gracias. Qué decir del baile... ainssssss como me gusta bailar, es algo que siempre me ha gustado y por ello empecé bailando con 4 añitos y suma y sigue. “El Baile” mi gran quita-stress, mi pasión, mi hobbie, mi quita-penas, mi quita-enfado, mi quita-amores. “La energía ni se crea ni se destruye, se BAILA”, me encanta esa frase y me encanta BAILAR. Empecé bailando desde pequeña, lo que no sabía ni me podía imaginar, es la cantidad de grandes personas que me iba a encontrar en ese mundo. Repinaico mio (Miguel), decirte que eres un gran amigo , gran persona y una gran pareja salsera de baile jejeje vamos a triunfar con esos shows y esas acrobacias “chungas” que hacemos... ole ole los caracoles, no cambies. Pimpollo mío (Juan), gran bailarín y gran persona, “que está pasandooooooooo???” 😊, por esos viajes y esas noches de pódium en el Titus bailando “y ya llegó la gosadera...” no cambies nunca. Gracias a los dos por compartir tantas cosas conmigo, sois especiales para mí y os aprecio un montón. A mis compañeros de baile por compartir grandes noches de flamenco, sevillanas, bachata, salsa, lambazouk y kizomba, sois y suma y sigue.

Y ya que no podían ser excluidos, agradecer a todos mis profes de baile; a mi Sara y mi Davilo que aunque haga el pino sigue sin dejarme el micro. Gracias Sara por esos momento zoukeros y flamencos que sólo tú y yo sabemos. Gracias a los dos por el cariño que me dais y por todo lo que me enseñáis en salsa, flamenco, zouk y bachata. Neus y Óscar (el papito lindo), gracias por ofrecerme entrar en la compañía de salsa y creer en mi, sois geniales. Gracias por esos momentos vividos en la academia y a nivel social, compartir momentos con vosotros es genial. Así que gracias de corazón a los 4 por todo el cariño que me dais, por ayudarme no sólo a crecer como bailarina, sino por todo el apoyo en cada show, por animarte con la Tesis y por entender mis “ausencias” porque estaba “anidando en casa” escribiéndola.

A mis amigos y profesores 🌸

Gracias a Joan Verdaguer, Eva Tolosa, Daniel Benítez, María Montoya y a Pepe por aceptar ser miembros de mi Tribunal de Tesis.

Al tribunal de la Tesis ☆

Gracias a mis queridos miembros de la UTPR por dejarme ir a irradiar sin pedir hora el día de antes, a mi secretaria Rosita (la de España jejeje) por enviarme esos mensajes de ánimo y por esas risas en los pasillos y a mi Pepe por hacerme reír y subirme la autoestima diciéndome guapa, aunque fuera uno de estos días en los que mirarte al espejo te hace daño.

Grandes personitas ☺

