

**TESIS DOCTORAL**

**EFEECTO DEL INTERFERÓN BETA  
EN LA DESTRUCCIÓN AUTOINMUNE  
DE LAS CÉLULAS BETA PANCREÁTICAS:  
GENERACIÓN, CARACTERIZACIÓN  
Y ESTUDIO DE UN MODELO  
EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 1**

**AURORA ALBA MOLINA**

**DIRECTORA DE LA TESIS  
DRA. MARTA VIVES-PI**

**SEPTIEMBRE 2005**

Agradecimientos

Abreviaturas

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	7
1. Inmunología y autoinmunidad .....	7
1.1 Generalidades del sistema inmune.....	7
1.2 Tolerancia .....	11
1.3 Autoinmunidad.....	14
2. Diabetes tipo 1 .....	18
2.1 El páncreas, los islotes y las células beta.....	18
2.2 Diabetes: definición y clasificación .....	21
2.3 Epidemiología .....	23
2.4 Etiología.....	25
2.4.1 Susceptibilidad genética.....	25
2.4.2 Factores ambientales de susceptibilidad.....	26
2.4.2.1 Factores geográficos y estacionales.....	26
2.4.2.2 Factores dietéticos.....	26
2.4.2.3 Patógenos y vacunas .....	28
2.4.2.4 Factores de riesgo antenatales.....	29
2.4.2.5 Toxinas, fármacos y/o productos químicos.....	30
2.4.2.6 Factores psicológicos .....	30
2.4.2.7 Factores estocásticos .....	30
2.5. Patogénesis.....	31
2.6 Criterios diagnósticos.....	36
2.7 Tratamiento de la DT1 .....	37
2.7.1 Administración exógena de insulina .....	37
2.7.2 Análogos de la insulina .....	38
2.7.3 Transplante de páncreas entero o islotes pancreáticos .....	38
2.7.3.1 Páncreas entero .....	38
2.7.3.2 Islotes pancreáticos.....	39
2.7.4 Otras estrategias terapéuticas: Terapia génica y células pluripotenciales .....	41

2.8 Complicaciones .....	42
2.9 Prevención de la DT1 .....	42
2.9.1 Prevención primaria .....	42
2.9.1 Prevención secundaria.....	44
3. Virus y diabetes tipo 1 .....	45
3.1 Virus implicados en el desarrollo de diabetes.....	46
3.2 Mecanismos de acción .....	50
4. Interferones de tipo 1 y diabetes .....	53
4.1 Generalidades de las citocinas.....	53
4.2 Los interferones: generalidades.....	53
4.3 Los interferones de tipo I .....	54
5. Modelos animales .....	57
5.1 Conceptos básicos .....	57
5.1.1 Cepas consanguíneas, endogámicas o inbred.....	57
5.1.2 Cepas no consanguíneas u outbred.....	58
5.1.3 Híbridos F1.....	58
5.1.4 Cepas congénicas.....	59
5.2 Modelos animales de diabetes tipo 1.....	60
5.2.1 Modelos inducidos farmacológicamente .....	60
5.2.1.1 Estreptozotocina (STZ).....	60
5.2.1.2 Aloxano.....	60
5.2.1.3 Ciclofosfamida (Cy) .....	61
5.2.2 Modelos espontáneos .....	61
5.2.2.1 El ratón nonobese diabetic (NOD).....	61
5.2.2.2 La rata Bio-Breeding (BB).....	65
5.2.2.3 La rata Long-Evans Tokushima Lean (LETL) .....	66
5.2.3 Modelos modificados genéticamente .....	66
5.2.3.1 Modelos transgénicos.....	67
5.2.3.1.1 Modelos transgénicos de TCR.....	67
5.2.3.1.2 Modelos transgénicos de moléculas de MHC.....	68
5.2.3.1.3 Modelos transgénicos de citocinas .....	68
5.2.3.1.4 Modelos transgénicos de autoantígenos.....	69
5.2.3.1.5 Modelos transgénicos de moléculas coestimuladoras .....	70
5.2.3.1.6 Modelos transgénicos de péptidos virales .....	70

5.2.3.1 Modelos knock-out.....	71
5.2.3.1.1 Modelos knock-out de moléculas de MHC.....	71
5.2.3.1.2 Modelos knock-out de citocinas .....	72
5.2.3.1.3 Modelos knock-out de autoantígenos .....	72
5.2.3.1.4 Modelos knock-out de moléculas coestimuladoras.....	73
5.3 Modelos usados como controles en el estudio de la DT1.....	73
5.3.1 El ratón nonobese resistant (NOR) .....	73
5.3.2 El ratón nonobese diabetic SCID (NOD-SCID) .....	74
5.3.3 El ratón C57BL/6J (B6) .....	75
5.4 Ventajas e inconvenientes del uso de modelos animales en el estudio de la DT1 .....	75
6. Antecedentes del estudio .....	77
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	79
OBJETIVOS DEL ESTUDIO .....	81
MATERIAL Y MÉTODOS.....	83
1. Animales.....	83
1.1 Procedencia.....	83
1.2 Identificación.....	84
1.3 Seguimiento y sacrificio de los animales .....	84
1.4 Genotipado del transgén.....	85
1.5 Transferencia del transgén a diferentes fondos genéticos: NOD y NOR RIP-HuIFN-beta, seguimiento mediante microsatélites. ....	87
1.6 Cepa NOD-SCID RIP-HuIFN-beta.....	89
1.7 Comité Ético de Experimentación Animal.....	91
2. Seguimiento metabólico .....	91
2.1 Glicemias .....	91
2.2 Radioinmunoensayo determinar la concentración de insulina.....	92
2.2.1 Insulinemia .....	92
2.2.2 Contenido pancreático de insulina .....	92
2.3 Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa.....	92
3. Determinación de IFN-beta humano .....	93
4. Inmunohistología .....	93

4.1	<i>Determinación del grado de insulinitis</i> .....	93
4.2	<i>Caracterización de la insulinitis</i> .....	95
4.3	<i>Detección de apoptosis</i> .....	96
5.	<i>Morfometría de los islotes</i> .....	97
5.1	<i>Masa pancreática</i> .....	98
5.2	<i>Área de los islotes</i> .....	98
5.3	<i>Área de las células beta</i> .....	98
5.4	<i>Replicación de las células beta</i> .....	98
6.	<i>Cuantificación relativa de las subpoblaciones linfocitarias: citometría</i> .....	99
6.1	<i>Procesamiento del bazo</i> .....	99
6.2	<i>Procesamiento de los ganglios regionales pancreáticos</i> .....	99
6.3	<i>Procesamiento del páncreas</i> .....	100
6.4	<i>Inmunofluorescencia directa en suspensión</i> .....	101
7.	<i>Transferencia adoptiva de la enfermedad</i> .....	102
8.	<i>PCR a tiempo real (RT-PCR)</i> .....	102
8.1	<i>Cuantificación de expresión génica mediante RT-PCR con el sistema LightCycler®</i> .....	102
8.1.1	<i>Extracción de RNA</i> .....	103
8.1.2	<i>Retrotranscripción</i> .....	105
8.1.3	<i>Primers, curvas patrón y condiciones de RT-PCR</i> .....	105
8.1.4	<i>Interpretación de los resultados</i> .....	106
8.2	<i>Microdissección láser y cuantificación génica mediante RT-PCR con el sistema ABI Prism 7000®</i> .....	107
8.2.1	<i>Obtención de la muestra: microdissección láser</i> .....	107
8.2.2	<i>Extracción del RNA</i> .....	109
8.2.3	<i>Retrotranscripción</i> .....	110
8.2.4	<i>Primers y RT-PCR</i> .....	110
8.2.5	<i>Interpretación de los resultados</i> .....	111
9.	<i>Bloqueo de la enfermedad mediante inmunoterapia</i> .....	112
10.	<i>Estadística</i> .....	112
	<b>RESULTADOS</b> .....	115
1.	<i>Incidencia de la enfermedad</i> .....	115
2.	<i>El transgén y su producto no alteran el metabolismo de la célula beta</i> .....	116

2.1	<i>El HuIFN-beta se detecta en el suero de los animales transgénicos....</i>	117
2.2.	<i>La presencia de HuIFN-beta no altera la normoglicemia .....</i>	117
2.3	<i>La insulinemia de los animales CD-1 RIP-HuIFN-beta es normal .....</i>	119
2.4	<i>El contenido pancreático de insulina no se encuentra alterado en los animales transgénicos .....</i>	122
2.5	<i>La respuesta insulínica a la glucosa es normal en los animales transgénicos .....</i>	123
2.6	<i>El producto del transgén no causa apoptosis en los islotes.....</i>	124
2.7	<i>El modelo NOD-SCID RIP-HuIFNbeta no desarrolla insulitis ni diabetes .....</i>	125
3.	<i>Inmunohistología .....</i>	126
3.1	<i>Determinación del grado de insulitis .....</i>	126
3.1.1	<i>Distribución del infiltrado en fondo genético CD-1.....</i>	127
3.1.2	<i>Distribución del infiltrado en fondo genético NOR.....</i>	128
3.1.3	<i>Distribución del infiltrado en fondo genético NOD.....</i>	128
3.1.4	<i>Influencia del fondo genético en la insulitis causada por IFN-beta.....</i>	129
3.2	<i>Inmunohistología de los islotes. Caracterización del infiltrado.....</i>	132
4.	<i>Estudios morfológicos .....</i>	136
4.1	<i>La expresión del transgén no afecta a la masa pancreática.....</i>	136
4.2	<i>Aumento del área de los islotes de los animales transgénicos.....</i>	137
4.3	<i>Los animales transgénicos presentan células beta de tamaño normal. ....</i>	138
4.4	<i>Los animales transgénicos no presentan alteraciones en el grado de proliferación de las células beta.....</i>	138
4.5	<i>La densidad celular de los islotes es igual en animales transgénicos y controles .....</i>	139
5.	<i>Cuantificación relativa de las subpoblaciones linfocitarias .....</i>	140
5.1	<i>El desarrollo de diabetes se asocia a variaciones en las poblaciones esplénicas en los animales transgénicos.....</i>	140
5.2	<i>La expresión del transgén no determina variaciones en las subpoblaciones linfocitarias de ganglio regional pancreático .....</i>	145
5.3	<i>El porcentaje de células NK a nivel pancreático se incrementa en animales transgénicos diabéticos jóvenes.....</i>	148
6.	<i>La enfermedad se transfiere mediante esplenocitos o linfocitos infiltrantes de páncreas de animales diabéticos a animales inmunodeficientes .....</i>	153

7. El IFN-beta humano no afecta a la expresión tímica de moléculas insulares .....	154
8. Presencia de IFN-gamma en el infiltrado de los animales RIP-HuIFN-beta	156
9. Los animales transgénicos diabéticos expresan MULT-1 a nivel insular ...	157
10. Las células NK son determinantes para el desarrollo de la diabetes acelerada.....	157
11. Los animales transgénicos diabéticos presentan una elevada expresión de TLRs relacionados con infección vírica .....	158
DISCUSIÓN .....	161
CONCLUSIONES.....	177
BIBLIOGRAFÍA RESULTANTE DE LA ETAPA PREDOCTORAL.....	179
REFERENCIAS.....	181

## INTRODUCCIÓN

### 1. Inmunología y autoinmunidad

#### 1.1 Generalidades del sistema inmune

El sistema inmune es el conjunto de células y moléculas encargadas de la defensa del organismo frente a posibles agentes patógenos. Es uno de los componentes más complejos del organismo. Los elementos básicos de este sistema se han conservado a lo largo del proceso evolutivo y existe un alto grado de homología entre moléculas de este sistema en diferentes especies<sup>1</sup>. En mamíferos, la mayoría de células del sistema inmune derivan de precursores hematopoyéticos en médula ósea.

Existen dos tipos de respuesta inmune: innata o natural y adaptativa o específica. La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa del organismo. Está formada por barreras físicas naturales (mucosas, epitelios y enzimas secretados por células que forman parte de estos tejidos), células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos), células asesinas naturales (*natural killer*, NK) y moléculas solubles como mediadores inflamatorios, citocinas y moléculas del sistema del complemento. En la inmunidad innata juegan un papel importante los *Toll-like receptors* (TLRs), que son receptores de membrana que reconocen componentes microbianos conservados y constitutivos denominados patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) y activan una respuesta inmediata mediada por macrófagos, neutrófilos, proteínas del complemento y a través de la producción de citocinas pueden modular la respuesta adaptativa<sup>2</sup>.

Los órganos linfoides son tejidos organizados donde los linfocitos interactúan con células linfoides y no linfoides que son importantes tanto para su maduración como para el inicio de la respuesta inmune adaptativa<sup>3</sup>. Se pueden dividir en órganos linfoides centrales o primarios, donde los linfocitos se generan y maduran y órganos linfoides secundarios, donde se organiza la respuesta inmune específica.

La respuesta inmune adaptativa implica la activación selectiva antígeno específica de linfocitos y la consiguiente acción de anticuerpos específicos y/o células efectoras. Los linfocitos B y T se originan en médula ósea a partir de



precursores hematopoyéticos pero sólo los linfocitos B maduran allí. Los linfocitos T migran a timo donde tendrá lugar su maduración. Médula ósea y timo son órganos linfoides primarios. Ambos tipos de linfocitos, una vez han madurado, circulan por el torrente sanguíneo y linfa desde donde migrarán a los órganos linfoides periféricos o secundarios donde tendrá lugar su activación. Los órganos linfoides secundarios se distribuyen por todo el organismo y comprenden: ganglios, bazo, tejidos linfoides asociados a intestino/*gut-associated lymphoid tissues* (GALT), tejidos linfoides asociados a bronquios/*bronchial-associated lymphoid tissues* (BALT) y tejidos linfoides asociados a mucosas/*mucosal-associated lymphoid tissues* (MALT). En los órganos linfoides periféricos, las células presentadoras de antígeno (*antigen presenting cells*, APCs) presentan los antígenos a los linfocitos *naive* o linfocitos que no han sido previamente expuestos a un antígeno. De este modo, los linfocitos se activan y proliferan diferenciándose en células efectoras productoras de anticuerpos, en el caso de los linfocitos B, y destruyendo células infectadas o activando otros tipos celulares en el caso de los linfocitos T. Después de activarse, un linfocito tarda unos días hasta que completa la expansión clonal y se diferencian en células efectoras. Una vez eliminado el antígeno, la mayoría de células antígeno-específicas entran en apoptosis pero algunas persisten (células memoria) para asegurar que en un segundo encuentro con el antígeno, se produzca una respuesta más rápida y eficaz.

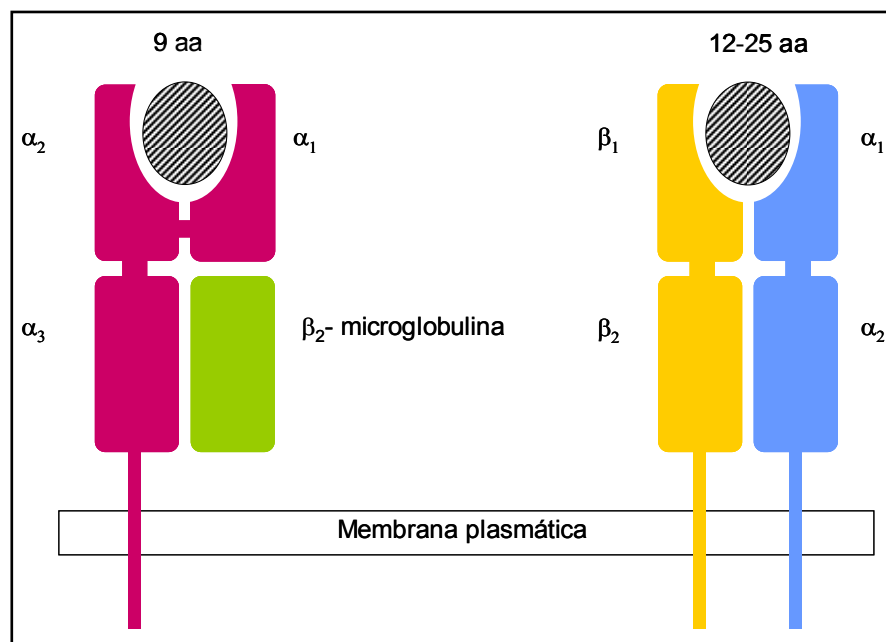
El primer paso para el inicio de la respuesta inmune adaptativa es la presentación antigénica. Los antígenos son moléculas insolubles de más de 10 kilodaltons (kD) de peso molecular que pueden tener más de un epítipo o determinante antigénico capaz de inducir una respuesta inmune. El antígeno es procesado por las APC, que principalmente son macrófagos, células dendríticas y células B, y reconvertido en fragmentos peptídicos que se expresan en la superficie de estas células dentro del surco de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC II) y reconocido por el receptor de antígeno de los linfocitos T CD4 (TCR). Cualquier célula del organismo -en caso de infección, tumor, estrés- puede presentar péptidos endógenos a través de su MHC de clase I a los linfocitos T CD8.

El complejo mayor de histocompatibilidad es un conjunto de genes localizados en el cromosoma 6 en humano y en el 17 murino que codifican para

un grupo de glicoproteínas de membrana denominadas moléculas de MHC<sup>4</sup>. Estas moléculas unen antígenos procesados en la célula y los presentan en la superficie celular a las diferentes poblaciones de linfocitos T. Constituye el grupo génico con más polimorfismos que existe, por eso estas moléculas también se denominan antígenos principales de histocompatibilidad<sup>3</sup>. El haplotipo de MHC es el grupo de genes heredados de los padres en un genoma haploide de forma codominante. El polimorfismo de las moléculas de MHC afectará a: el espectro de péptidos unidos, la conformación del péptido unido y las interacción directa con la molécula de TCR, de forma que la célula T reconocerá péptidos unidos a una variante alélica determinada de MHC pero no el mismo péptido unido a otro MHC. En humanos, esta molécula se denomina también HLA (*human leucocyte antigen*, HLA). Este polimorfismo determinará que ciertos haplotipos de MHC estén asociados a más susceptibilidad a ciertas enfermedades infecciosas o autoinmunes. Las moléculas de MHC se dividen en dos clases principales según su función, estructura y distribución:

- La molécula de MHC de clase I está formada por dos cadenas polipeptídicas: una cadena alfa o pesada, polimórfica codificada en el MHC y una cadena más pequeña no polimórfica asociada no covalentemente y codificada en otro cromosoma (cromosoma 15 en humano y 2 en ratón)<sup>5,6</sup>, la beta-2-microglobulina (**Figura 1**). Existen tres genes principales de clase I, que se denominan HLA-A, -B y -C en humanos y H-2K, -D y -L en ratón. Las moléculas de MHC de clase I se encuentran expresadas en todas las células nucleadas del organismo. Presentan fragmentos peptídicos sintetizados en el citosol que se han procesado en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi y que provienen del metabolismo celular, del procesamiento de virus y bacterias que se replican en el citosol. Los péptidos que presentan son generalmente entre 8 y 10 aminoácidos, principalmente nonámeros<sup>4</sup>. La molécula de MHC de clase I con el péptido unido es reconocida por el TCR de células T CD8 citotóxicas que mediante diferentes mecanismos determinará la eliminación de la célula diana.

- La molécula de MHC de clase II está formada por dos cadenas polimórficas, alfa y beta que se unen de forma no covalente (**Figura 1**). Existen tres genes principales de clase II, que se denominan HLA-DR, -DP y -DQ en humanos y H-2A y H-2E en ratón. Estas moléculas se expresan principalmente en las APCs, presentan fundamentalmente péptidos procesados en la vía endocítica. Los péptidos que se unen tienen entre 12 y 25 residuos siendo la mayoría de 15 aminoácidos<sup>4</sup>. La molécula de MHC de clase II con el péptido unido es reconocida por células T CD4. Las células T CD4 o T *helper* principalmente activan macrófagos y células B.



**Figura 1.** Estructura de las moléculas de MHC.

Los linfocitos T CD4 se dividen en tres subpoblaciones en función del perfil de citocinas que secretan al activarse y por consiguiente, el tipo de respuesta inmune que favorecen<sup>3</sup>:

- Th1: secretan predominantemente interleucina-2 (IL-2), interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral-beta (TNF $\beta$ ). Activan macrófagos e inician la inmunidad mediada por células y citotoxicidad.

Tienen un efecto limitado sobre la producción de anticuerpos y median una respuesta celular.

- Th2: secretan predominantemente IL-4, IL-5, e IL-10. Activan células B y favorecen la inmunidad humoral o mediada por anticuerpos.
- Th3: producen TGF-beta. Esta citocina tiene múltiples efectos inmunosupresores a nivel celular, de forma que puede inhibir el ciclo celular de linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y células NK<sup>7</sup>.

En la mayoría de respuestas inmunes se establece un equilibrio entre los dos tipos de respuesta (mixta), pero hay determinados antígenos que inducen una respuesta exclusivamente Th1 o Th2.

Los linfocitos B tienen inmunoglobulinas de membrana como receptores para el antígeno. Una vez maduros, emigran de médula ósea, se desplazan a los órganos linfoides secundarios donde se localizan en los folículos linfoides primarios. Para su activación es necesaria la unión del antígeno (principalmente proteínas monoméricas) a la inmunoglobulina de membrana. El complejo antígeno-inmunoglobulina se internaliza, el antígeno se procesa y es presentado a través del MHC de clase II a una célula T CD4 *helper* antígeno específica. Se inicia una fase de proliferación, en los denominados centros germinales, que dará lugar a células plasmáticas secretoras de anticuerpos y células B memoria con igual especificidad. Las inmunoglobulinas solubles que son secretadas, se unen al patógeno extracelular que provocó la respuesta opsonizándolo e iniciando vías de eliminación (complemento) y por otro lado, recluta a otras células y moléculas para eliminarlo.

## **1.2 Tolerancia**

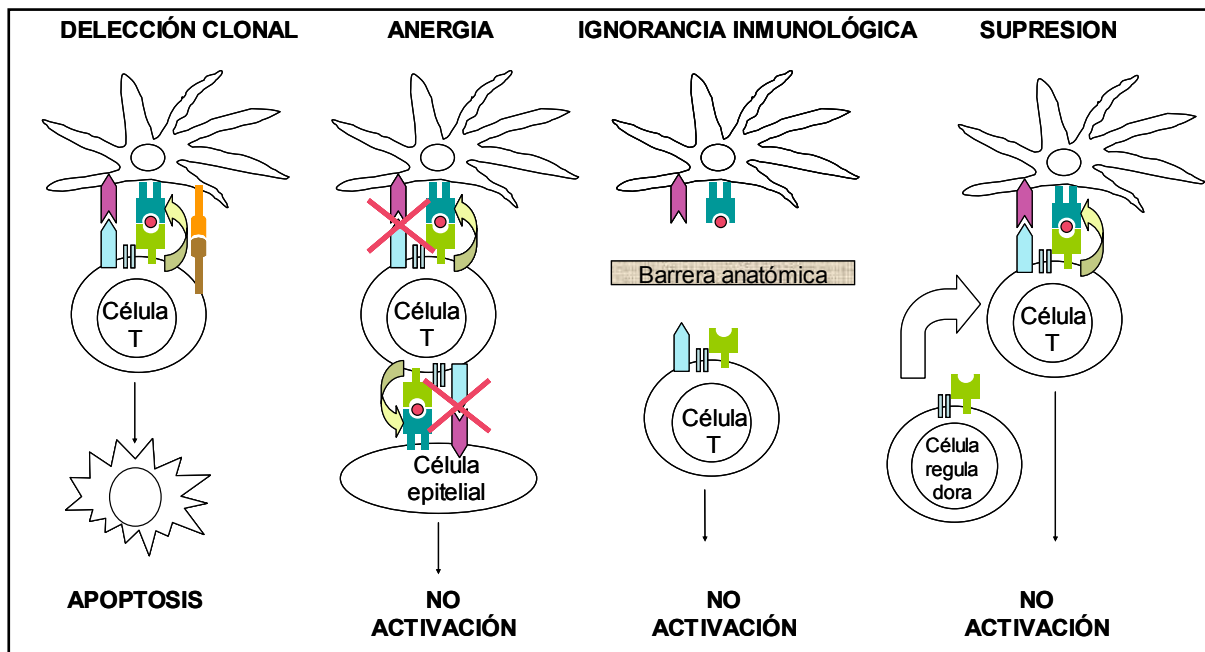
Se puede definir la tolerancia inmunológica como un estado fisiológico en el que el sistema inmune no reacciona de forma destructiva contra el propio organismo<sup>8</sup>. La tolerancia inmunológica se asegura eliminando o inhibiendo del organismo linfocitos autoreactivos<sup>9</sup>. Los procesos de tolerancia central tienen lugar en los órganos linfoides primarios y se eliminan clones de linfocitos inmaduros (*delección clonal*) que reconocen antígenos propios que se

encuentran a elevadas concentraciones en timo y médula ósea, mediante apoptosis mediada por Fas (CD95)<sup>10</sup>. En el córtex del timo tiene lugar el proceso de selección positiva de los timocitos: sobrevivirán los linfocitos T maduros que reconozcan los complejos antígeno propio-MHC con baja avidéz, de forma que no se activen pero se mantengan vivos. Los timocitos que expresen un TCR que no reconozca o se una fuertemente al complejo antígeno propio-MHC, se eliminarán mediante apoptosis. En el proceso de selección negativa que principalmente ocurre en la zona cortico-medular, células que expresan receptores con elevada afinidad por antígenos propios se eliminan mediante apoptosis<sup>3,11</sup>. La selección tímica se considera particularmente efectiva para antígenos ubiquitarios y ampliamente expresados<sup>12</sup>. Los mecanismos de tolerancia periférica, que tienen lugar en los órganos linfoides secundarios, son necesarios para mantener bajo un estricto control a las células autoreactivas que escapan de timo, lo cual ocurre en todos los individuos. Además de los mecanismos de selección clonal (**Figura 2**), existen otros mecanismos de tolerancia periférica:

- *Anergia*: para que se produzca la activación de los linfocitos T, tiene que haber reconocimiento del TCR por el complejo antígeno-MHC en la superficie de la APC (primera señal) y por otro lado, tiene que haber una segunda señal (coestimulación) independiente del antígeno por parte de la APC (**Figura 2**). Las moléculas coestimuladoras mejor estudiadas son las de la familia B7 que transmiten una señal coestimuladora a través del receptor CD28 de las células T. La ausencia de coestimulación no activa a la célula T y la deja en un estado de anergia en el que es refractaria a la activación. Estas células anérgicas, incapaces de producir IL-2, pueden participar en respuestas inmunes en determinadas circunstancias aunque su umbral de activación es más elevado<sup>9</sup>. Se han observado células T anérgicas después de una estimulación antigénica crónica<sup>13</sup>.
- *Ignorancia*: Es un fenómeno pasivo por el que células T autoreactivas no se activan por estar físicamente separadas del antígeno diana. Es el mecanismo de tolerancia que se establece para antígenos secuestrados.

Los clones de células autoreactivas que se encuentran en estado de ignorancia pueden activarse cuando hay daño tisular en los tejidos que contienen antígenos secuestrados para los cuales muestran especificidad (**Figura 2**).

- *Supresión activa/células reguladoras*: se han descrito una variedad de células que suprimen de forma activa el tráfico, diferenciación y/o funciones efectoras de las células T autoreactivas (**Figura 2**):
  - Las células reguladoras naturales son las células T CD4+CD25+ que se originan en el timo como consecuencia de de una selección positiva que implica interacciones de afinidad intermedia, mientras que las CD4+ convencionales se selecciona en función de una afinidad baja<sup>14</sup>. Estas células reguladoras suponen del 5 al 10% de todas las células CD4+ periféricas<sup>15</sup>. En periferia estas células expresan otros marcadores que se expresan diferencialmente en función del estado de activación y permite hacer subdivisiones.
  - Las células reguladoras adaptativas se generan como consecuencia de estímulos específicos y se caracterizan por la producción de citocinas inmunosupresoras como TGFβ, IL-10 e IL-4<sup>16</sup>. Encontramos en este grupo: células Tαβ CD4+, Tαβ CD8+ y Tγδ CD8+.
  - Las células NKT se han relacionado con la regulación de autoinmunidad, en especial en DT1. Son células con un repertorio de TCR altamente conservado, pueden ser CD4+ o doble negativas CD4-CD8- y expresan receptores característicos de células NK<sup>17</sup>. Pueden secretar IFN-gamma o IL-4 en función de la naturaleza del estímulo<sup>18</sup>. Promueven respuestas Th2 e inducen anergia en células T autoreactivas<sup>19</sup>.



**Figura 2.** Mecanismos de tolerancia

### 1.3 Autoinmunidad

La tolerancia como concepto y en consecuencia la autoinmunidad y las enfermedades autoinmunes no se reconocen hasta mediados del siglo XX<sup>20</sup>. Se puede definir una enfermedad autoinmune como una condición patológica en la que se produce un daño estructural y/o funcional a consecuencia de una respuesta mediada por células y/o anticuerpos contra componentes del propio organismo. Las enfermedades autoinmunes se pueden clasificar en dos grandes grupos desde un punto de vista clínico:

- 1) *Enfermedades autoinmunes sistémicas:* caracterizadas por una respuesta aberrante hacia antígenos propios ubicitarios (por ejemplo, el DNA de doble cadena) y como consecuencia se producen lesiones en múltiples tejidos. El ejemplo más clásico de este tipo de enfermedades es el Lupus Eritematoso Sistémico.
- 2) *Enfermedades autoinmunes órgano-específicas:* la respuesta autoinmune va dirigida contra un órgano o tipo celular específico.

Como consecuencia el tejido diana queda dañado o su función bloqueada/estimulada permanentemente. Aunque prácticamente cualquier órgano puede ser diana de una respuesta autoinmune, existe una especial predilección por el tejido endocrino. Las enfermedades autoinmunes de tiroides, páncreas y glándulas adrenales suponen el 50% del total de enfermedades autoinmunes órgano-específicas en Europa y Estados Unidos<sup>21</sup>.

Un 3% de la población mundial presenta alguna enfermedad autoinmune<sup>22</sup>. Hay unas 80 enfermedades descritas que se piensa que son de origen autoinmune<sup>23</sup>. Existe una disparidad entre sexos y la mayoría de enfermedades autoinmunes presentan una mayor incidencia en mujeres<sup>24</sup> y en consecuencia, las enfermedades autoinmunes son una de las mayores causas de mortalidad en mujeres jóvenes y de mediana edad en los Estados Unidos<sup>25</sup>. Las mayores diferencias se observan en el síndrome de Sjogren, Lupus Eritematoso Sistémico, enfermedades autoinmunes de la glándula tiroides (tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Graves) y escleroderma, en las que más del 80% de los afectados son mujeres<sup>26</sup>. Por contra, en el caso concreto de la diabetes autoinmune la incidencia es similar entre sexos<sup>27</sup>. Existen notables diferencias en la edad de inicio de las diferentes enfermedades autoinmunes, aunque en principio pueden desarrollarse a cualquier edad, cada una presenta un pico característico de máxima incidencia.

Aunque en 1957 se definieron los postulados de Witebsky<sup>28</sup> con el objetivo de establecer los criterios para definir una enfermedad autoinmune, estos postulados fueron revisados a principios de los años 90<sup>29</sup>. Se establecen tres tipos de evidencias para clasificar una enfermedad como autoinmune:

- 1) *evidencias directas*: aplicable a enfermedades mediadas por autoanticuerpos. La transfusión de suero o inmunoglobulinas purificadas a un paciente sano o a un modelo experimental animal, reproduce las lesiones de la enfermedad.
- 2) *evidencias indirectas*: aplicable a enfermedades en las que el proceso está causado por principalmente por células T.



- a. reproducción de la enfermedad en un modelo animal, donde el antígeno es similar al de la enfermedad humana, mediante inmunización
  - b. modelos animales inducidos mediante manipulación genética
  - c. aislamiento de autoanticuerpos o células T autoreactivas de los órganos diana del ataque autoinmune
- 3) *evidencias circunstanciales*: por sí mismas no definen una enfermedad autoinmune pero aportan información de interés.
- a. asociación de otra enfermedad autoinmune en el mismo individuo o familia
  - b. infiltración linfocitaria del órgano diana
  - c. asociación con un determinado haplotipo de MHC o expresión aberrante de MHC de clase II en el órgano afectado
  - d. respuesta favorable a la inmunosupresión

La mayoría de enfermedades autoinmunes son multigénicas siendo los alelos del MHC los que contribuyen de forma más importante a la susceptibilidad genética a desarrollar una enfermedad<sup>30</sup>. El mismo alelo que se asocia a susceptibilidad en una enfermedad, puede conferir resistencia a otra: por ejemplo, el alelo HLA-DQB1\*0602 se asocia al desarrollo de esclerosis múltiple pero es muy poco frecuente en pacientes con diabetes tipo 1<sup>31,32</sup>. La concordancia entre gemelos idénticos nunca es del 100%, pero es superior a la de hermanos con idéntico MHC, lo cual indica que otros genes no relacionados con el MHC pueden conferir susceptibilidad y que los factores ambientales tienen también importancia en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes<sup>33,34,35</sup> (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Riesgo genético relativo en diferentes enfermedades autoinmunes.

Enfermedad autoinmune	ratio de concordancia (%)		
	Gemelos monocigóticos	Gemelos dicigóticos	Hermanos no gemelos
Diabetes Tipo 1	30-50	0-13	6
Múltiple esclerosis	25	0-5	3-5
Lupus Eritematoso Sistémico	24-57	2-5	2-5
Artritis Reumatoide	12-15	3-4	2-4

Algunas de estas enfermedades como el síndrome linfoproliferativo autoinmune o el síndrome de endocrinopatía poliglandular autoinmune con candidiasis y displasia ectodermal (APECED) son resultado de la mutación en un solo gen<sup>30</sup>.

Factores no genéticos también se han relacionado con la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades autoinmunes. Algunas infecciones microbianas y parasitarias pueden inducir autoinmunidad mediante mecanismos de mimetismo molecular, activación policlonal de linfocitos, modificación de antígenos propios, dispersión de antígenos secuestrados y un mecanismos idiotípicos<sup>30,36</sup>.

Otros factores no genéticos como neoplasias, fármacos, antígenos alimentarios o el área geográfica<sup>37</sup>, se han relacionado también con el desarrollo de estas enfermedades (**Tabla 2**).

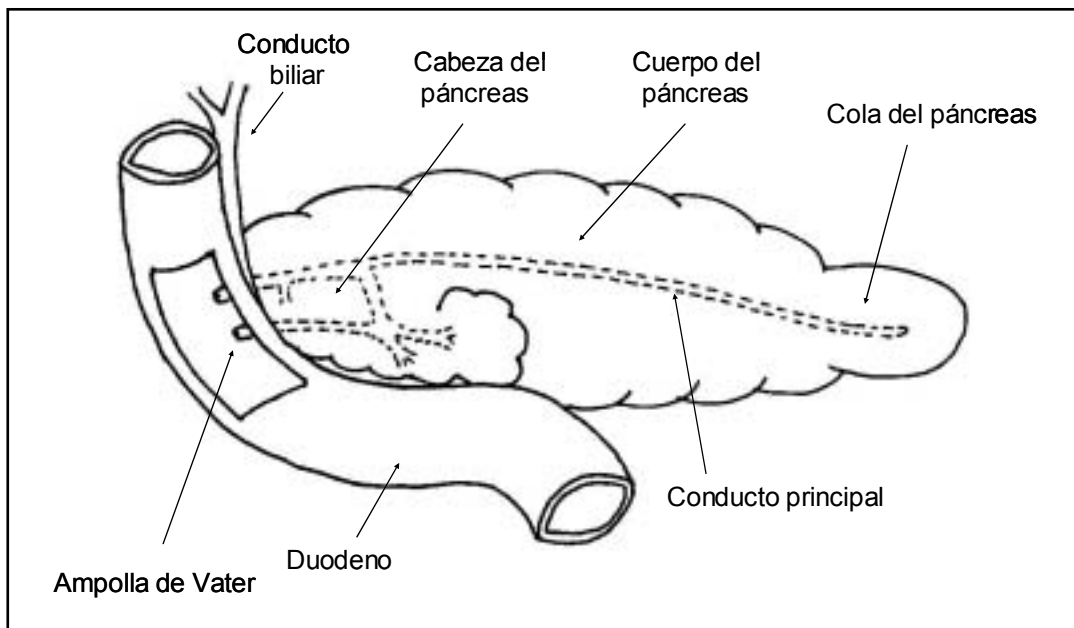
**Tabla 2.** Factores implicados en el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

Factor	Ejemplo	Enfermedad autoinmune
Tumor	Carcinoma ovárico Timoma	Degeneración cerebelar Miastenia gravis
Fármaco	Dimetilcisteína	Lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, polimiositis...
Antígeno alimentario	Gluten	Enfermedad celíaca
Agente infeccioso	<i>Streptococcus</i>	Fiebre reumática
Parasitación	<i>Leishmania</i>	Lupus eritematoso sistémico

## 2. Diabetes tipo 1

### 2.1 El páncreas, los islotes y las células beta

El páncreas es un órgano que se localiza transversalmente en el abdomen, detrás del estómago. Se distinguen tres zonas: la cabeza que es la parte más gruesa se encuentra en la curva del duodeno, el cuerpo del páncreas se localiza hacia la izquierda y finalmente la cola se encuentra junto al bazo (**Figura 3**).



**Figura 3.** Anatomía del páncreas.

El páncreas se desarrolla a partir de una evaginación del endodermo embrionario y está formado por dos tejidos funcionalmente diferentes: el páncreas exocrino, encargado de producir las enzimas digestivas para procesar los alimentos ingeridos, de forma que puedan ser absorbidos y el páncreas endocrino, encargado de modular el metabolismo de los nutrientes mediante una serie de hormonas<sup>38</sup>.

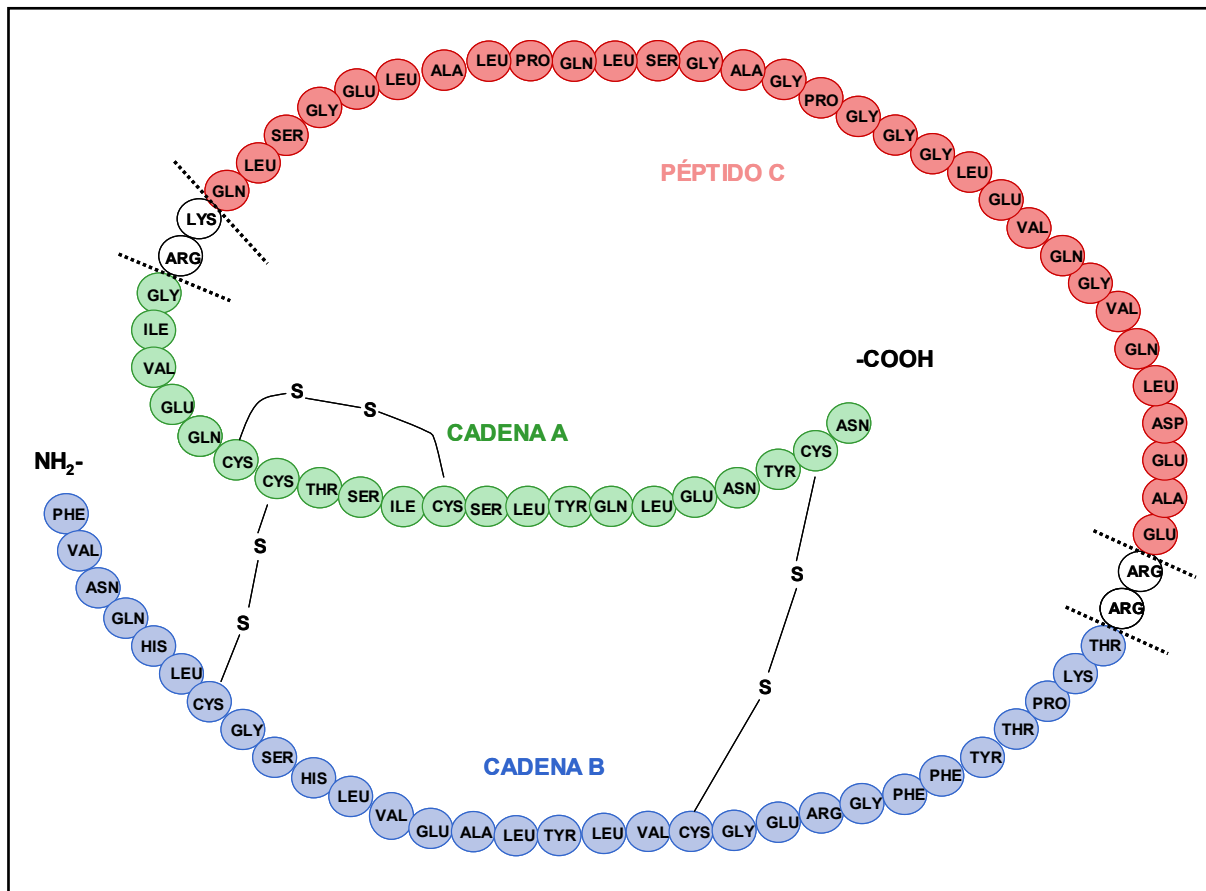
El páncreas endocrino constituye aproximadamente el 1-4% del tejido pancreático y está formado por una serie de pequeñas glándulas endocrinas independientes denominadas islotes de Langerhans<sup>39</sup>. Estos islotes tienen aproximadamente unas 2500 células de promedio aunque el rango es muy amplio. Están formados por varios tipos de células endocrinas:

- células beta productoras de insulina, 80% del islote

- células alfa productoras de glucagón, 12% del islote
- células delta productoras de somatostatina, 6% del islote
- células PP productoras de polipéptido pancreático, 2% del islote

En roedores existe una segregación de las células, de forma que las células beta se localizan en el centro y los otros tipos en la periferia, mientras que en humanos, aunque esta distribución existe, es menos evidente<sup>40</sup>. Los islotes están muy vascularizados, reciben 5 veces más aporte sanguíneo que el tejido exocrino adyacente. El flujo sanguíneo se distribuye de la zona central a la periferia de forma que la concentración de insulina modula la secreción de las otras hormonas. Los islotes pancreáticos están considerablemente inervados por nervios parasimpáticos, simpáticos y sensoriales, cuyas fibras entran en los islotes con los vasos sanguíneos y forman una red peri-insular y/o entran directamente al islote<sup>41</sup>. Esta estructura compleja, junto con la cantidad de neurotransmisores identificados en los islotes, es esencial para el control de la secreción endocrina<sup>42</sup>.

El gen de la insulina se localiza en el cromosoma 11 en humanos. En ratón existen dos genes de insulina: la insulina 2 que sería la homóloga a la insulina humana y se localiza en el cromosoma 7 y la insulina 1 que parece ser el resultado de una duplicación génica y se localiza en el cromosoma 19<sup>43</sup>. La insulina es una proteína de aproximadamente 5000 daltons, formada por 51 aminoácidos contenidos en 2 cadenas de péptidos: la cadena A de 21 aminoácidos y la cadena B de 30 aminoácidos, conectadas ambas por dos puentes disulfuro<sup>38</sup>. La insulina es el resultado del procesamiento de la proinsulina que es una molécula de 11.500 daltons que se produce en el retículo endoplasmático de la célula beta. Esta molécula se escinde por las enzimas microsomales en proinsulina (de 9.000 daltons), justo después de sintetizarse. En el aparato del Golgi la proinsulina se embala en unos gránulos secretorios recubiertos de clatrina que tras madurar, pierden la envuelta y mediante escisión de dos pares de aminoácidos dibásicos, dan lugar a la insulina y un péptido conector denominado péptido C (**Figura 4**).



**Figura 4.** Estructura de la preinsulina humana

Existe una secreción basal de insulina. La glucosa es el estímulo más potente para la secreción de insulina por parte de los islotes, aunque estímulos inducidos por otros nutrientes, hormonas, señales nerviosas y fármacos pueden modular también la secreción<sup>44</sup>. La glucosa entra en la célula beta por difusión pasiva a través de una proteína de membrana denominada transportador de glucosa 2 (*glucose transporter-2*, GLUT2)<sup>38</sup>. Una elevada concentración de glucosa mantenida más de 24 horas implica una desensibilización reversible de las células beta a la respuesta por glucosa pero no por otros estímulos.

En general, la principal función de la insulina es promover el almacenamiento de los nutrientes ingeridos. Los efectos más importantes de esta hormona:

- a) *paracrin*os: inhibe la secreción de glucagón por parte de las células alfa.

b) *endocrinos*:

- hígado: promueve la síntesis de glucógeno e incrementa la síntesis de proteína, triglicéridos, colesterol y VLDL. Por otro lado inhibe la glucogenolisis, cetogénesis y gluconeogénesis hepáticas.
- músculo: promueve la síntesis de proteína y glucógeno.
- tejido adiposo: promueve el almacenamiento de triglicéridos.

## **2.2 Diabetes: definición y clasificación**

El término diabetes describe un desorden metabólico de etiología múltiple caracterizado por un hiperglicemia crónica, en el que se produce un desequilibrio del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas debido a una alteración en la secreción y/o acción de la insulina<sup>45</sup>.

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en el siglo I por Arateo que la describió como una alteración caracterizada por polidipsia, poliuria, pérdida de peso, deshidratación y muerte precoz<sup>46</sup>. Algunos antiguos escritos egipcios, hindús y chinos hacen referencia a diferentes síntomas de enfermos afectados con esta patología.

Recientemente se han revisado los criterios para la clasificación de la diabetes y se han definido los siguientes tipos<sup>47</sup>:

### *1) Diabetes tipo 1 (DT1)*

Dentro de esta forma de diabetes se incluyen aquellos casos en que hay una destrucción de la masa celular beta productora de insulina y una tendencia a la cetoacidosis. En esta categoría encontramos dos subtipos:

- a) *Diabetes tipo 1A o diabetes inmunomediada*: se caracteriza por una destrucción selectiva de las células beta pancreáticas mediada por células del sistema inmune. Es una de las enfermedades de carácter crónico más comunes y afecta a 1 de cada 300 niños<sup>48</sup>. Se detectan marcadores de la destrucción autoinmune: autoanticuerpos contra islote (ICA), insulina (IAAs), GAD (GADAs) y contra las tirosin fosfatasas IA-2 e IA-2β. Existe una fuerte asociación con los alelos HLA-DR/DQ que pueden ser predisponentes o protectores. La diabetes inmunomediada normalmente aparece en la niñez o la juventud pero puede ocurrir a cualquier edad. Los pacientes con DT1 y sus familiares de primer grado,

tienen un riesgo elevado de padecer otras enfermedades autoinmunes como tiroiditis autoinmune y enfermedad de Addison. Señalar que uno de cada 20 pacientes diagnosticados con DT1 padece la enfermedad celíaca sin síntomas y se identifican mediante determinación de anticuerpos anti-transglutaminasa<sup>49</sup>.

- b) *Diabetes tipo 1B o diabetes idiopática*: la etiología es desconocida. Los enfermos presentan insulinopenia permanente con tendencia a la cetoacidosis pero no existen evidencias de autoinmunidad contra la célula beta. La mayoría de los pacientes son de origen africano o asiático. Presenta una alta heredabilidad que no está asociada al HLA.
  
- c) *LADA (latent autoimmune diabetes of adults)*: este término define a un grupo de pacientes adultos con marcadores inmunológicos de diabetes tipo 1 que en el momento del diagnóstico no requieren tratamiento con insulina<sup>50</sup>. Estos pacientes presentan susceptibilidad genética y presencia de autoanticuerpos contra islote similar a los afectados con diabetes tipo 1A. Los factores que se han relacionado con la destrucción más lenta de la masa celular beta incluyen: contribución de genes protectores, regeneración parcial de las células beta, inducción de tolerancia una vez se ha iniciado el proceso inmune y reducción cualitativa y cuantitativa a los factores ambientales que determinan la destrucción de la masa celular beta.

## 2) *Diabetes tipo 2 (DT2)*

Es la forma más frecuente de diabetes con una prevalencia del 2,8% en la población mundial en el año 2000 y una predicción del 4,4% en el año 2030 que implica unos 366 millones de personas afectadas<sup>51</sup>.

En este grupo se incluyen individuos que demuestran resistencia a la insulina y en ocasiones una relativa deficiencia de la hormona. La patogénesis de esta enfermedad indica que en individuos genéticamente predispuestos se produce inicialmente resistencia a la insulina por defectos en los transportadores de glucosa o alteración de la cascada de acción de la insulina con señalización aberrante producida por factores externos<sup>52</sup>. Existen 5

transportadores de glucosa distribuidos por diferentes tejidos del organismo. En la homeostasis de la glucosa tiene especial importancia el transportador de glucosa GLUT-4, como se demuestra en ratones en los que uno de los alelos del gen se ha anulado: muestran una grave resistencia a la insulina y la mitad de los machos desarrolla diabetes con la edad<sup>53</sup>. Esta resistencia a la insulina produce progresivamente un deterioro de la función celular beta para lo que se han postulado diferentes mecanismos aún en estudio: toxicidad de la elevada concentración de glucosa, agotamiento de las células beta, alteración en la síntesis de insulina y lipotoxicidad derivada de los productos metabólicos del exceso de ácidos grasos circulantes<sup>54</sup>. No se produce una destrucción autoinmune de las células beta. La mayoría de pacientes son obesos y tienen un elevado riesgo de padecer complicaciones macro y microvasculares<sup>47</sup>. La cetoacidosis puede producirse en asociación con estrés o infecciones.

### 3) *Diabetes gestacional*

Se incluye en este tipo cualquier tipo de intolerancia a la glucosa que se manifiesta durante el embarazo. Normalmente aparece en el último tercio de gestación y aunque habitualmente desaparece después del parto, la paciente debe ser reclasificada si la intolerancia persiste 6 semanas después. Aunque muchas de las pacientes diagnosticadas con diabetes gestacional no desarrollan diabetes posteriormente, otras se diagnostican años después con alguno de los otros tipos principalmente diabetes tipo 2<sup>55</sup>. En caso de existir marcadores de autoinmunidad contra la célula beta, aumenta el riesgo de padecer diabetes tipo 1<sup>56</sup>.

### 4) *Otros tipos específicos de diabetes*

En esta categoría se incluyen diferentes formas de diabetes derivadas principalmente de defectos genéticos de la célula beta y la acción de la insulina, la diabetes tóxica inducida por fármacos y/o productos químicos y la diabetes quirúrgica resultado de la excisión parcial o total del páncreas.

## **2.3 Epidemiología**

La incidencia de la DT1 en los últimos años, ha sido estudiada a nivel mundial por el *Diabetes Mondiale (DiaMond) project group*<sup>37,57</sup>, que depende de



la Organización Mundial de la Salud (OMS). En este estudio se han recogido datos de nuevos casos de diabetes tipo 1 -entre 1990 y 1994- en pacientes de menos de 14 años de 50 países. La incidencia mundial varía entre 0,1 por año en China o Venezuela a 36,8 en Cerdeña o 36,5 en Finlandia. Las incidencias más altas se encuentran en poblaciones caucasoides, con especial mención a las del Norte de Europa, y los índices más bajos aparecen en Asia y Sudamérica. En Cataluña la incidencia es de 12,5 por año y no existen diferencias entre sexos. La incidencia aumenta con la edad y es más alta en niños entre 10-14 años. El conocido gradiente norte-sur parece no ser tan evidente como se creía<sup>58</sup>. Esta variación geográfica de la incidencia, parece estar asociada a la distribución étnica y racial de las poblaciones. En estudios llevados a cabo en áreas geográficas de gran variedad étnica, se confirma que los diferentes grupos étnicos tienen una incidencia de diabetes muy diferente. Mientras que la enfermedad es más frecuente en personas con ascendentes en el Norte de Europa, en otros grupos raciales como negros, nativos americanos y asiáticos la enfermedad es menos común. A nivel global parece no haber diferencias ratio varón/mujer. Parece haber una tendencia a encontrar más casos en mujeres en poblaciones de baja incidencia y más varones en las poblaciones de incidencia más alta<sup>59</sup>.

En general, puede decirse que la incidencia de la enfermedad está aumentando a nivel mundial en aproximadamente un 3% anual, particularmente en aquellas poblaciones que se consideraban de riesgo bajo<sup>60</sup>. Los ratios de aumento varían también en función de la edad (**Tabla 3**), aumentando el número de casos en niños más pequeños.

**Tabla 3.** Ratio de incremento de la DT1 en niños de diferentes rangos de edad.

Edad (años)	Ratio de incremento
0-4	6,3%
5-9	3,1%
10-14	2,4%

## 2.4 Etiología

La DT1 inmunomediada es una enfermedad multifactorial de etiología desconocida en la que factores genéticos y ambientales juegan un papel importante<sup>61</sup>.

### 2.4.1 Susceptibilidad genética

La susceptibilidad genética a la DT1 depende de la interacción de múltiples genes siendo la contribución más fuerte conocida la de los alelos del MHC. Los polimorfismos en las moléculas de MHC de clase II son los más importantes en términos de susceptibilidad a la DT1, ya que estas moléculas determinan: por un lado, los péptidos que se unen y se presentan a las células T en los ganglios e islotes y por otro lado, el repertorio de linfocitos T a nivel tímico<sup>48</sup>. Estos genes de susceptibilidad se localizan en el locus HLA-DQ en el cromosoma 6 en humanos<sup>62</sup> y en el cromosoma 17 en ratón<sup>63</sup>. Los haplotipos más relacionados con el desarrollo de DT1 son los asociados a DR3 y DR4. Algunos haplotipos como DQA1\*0301-B1\*0302 y A1\*0501-B1\*0201 confieren susceptibilidad a la enfermedad, mientras que otros como DQA1\*0102-B1\*0602 confieren un papel protector<sup>64</sup>. Los mecanismos específicos por los que ciertos alelos confieren susceptibilidad y otros protección no están muy claros hasta el momento. Se postula que los alelos de MHC de alto riesgo podrían presentar péptidos específicos de la célula diana a los linfocitos T<sup>65</sup>, mientras que los alelos protectores cuando se expresan en timo conducen a la delección los linfocitos T con receptores que reconocen péptidos insulares<sup>66</sup>. Las secuencias asociadas a diabetes, tanto el DQ humano como en el IA murino (I-A<sup>97</sup>) llevan una serina en la posición 57 de la cadena beta en lugar de ácido aspártico conservado en otros alelos que confieren menor riesgo a la enfermedad<sup>67, 68</sup>.

Hasta la fecha se han identificado numerosos loci (aproximadamente 20), denominados *IDDM* en humanos, *Idd* en ratón e *iddm* en rata, como genes candidatos a conferir susceptibilidad a la enfermedad<sup>69</sup>. Hasta el momento pocos genes han sido identificados de forma reproducible. En humano el locus IDDM2 es una región polimórfica que se identifica con *insulin gene variable number tandem mini-satellite repeats* (INS-VNTR) y que determina la expresión de insulina en timo: los segmentos cortos, denominados VNTR de clase I se asocia a una resistencia a la enfermedad y los segmentos largos (VNTR de

clase III) confieren un efecto dominante protector. Otro locus asociado es IDDM12, que se identifica con el gen de la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4) en humanos<sup>70</sup>. Recientemente se han descrito polimorfismos en otros dos genes que podrían conferir susceptibilidad a la enfermedad: el gen de la *lymphoid protein tyrosine phosphatase* (LYP)<sup>71</sup> y el gen de la *small ubiquitin-like modifier 4* (SUMO4)<sup>72</sup>. En ratón, los genes no ligados al MHC que se han asociado con susceptibilidad a la enfermedad son CTLA4 y beta-2-microglobulina<sup>73</sup>.

## **2.4.2 Factores ambientales de susceptibilidad**

Aunque la predisposición genética es un requisito importante para desarrollar la enfermedad, algunas evidencias –principalmente epidemiológicas- apuntan a un papel crítico de los factores ambientales: sólo un 10% de los individuos predispuestos genéticamente progresa hacia una diabetes clínica<sup>62</sup>; la concordancia de la enfermedad es sólo de un 50% aproximado entre gemelos univitelinos<sup>33,74</sup>; existen variaciones geográficas; se se ha descrito una incidencia estacional de la enfermedad, con picos en otoño e invierno<sup>58</sup> y existen estudios epidemiológicos de emigrantes a zonas de mayor incidencia que resultan en un aumento de la enfermedad<sup>61</sup>.

Algunos de los posibles factores ambientales relacionados con la enfermedad son los siguientes:

### **2.4.2.1 Factores geográficos y estacionales**

Cuando se estudia la incidencia de diabetes en función de la latitud, parece existir un gradiente norte-sur, con un aumento de la incidencia en los países más alejados del ecuador (excepciones son Cerdeña e Islandia) y con una acumulación de nuevos casos en las épocas más frías del año<sup>61</sup>.

### **2.4.2.2 Factores dietéticos**

#### ➤ *Proteína de la leche de vaca*

Algunos estudios han correlacionado la edad de inicio del consumo de leche de vaca con la incidencia de DT1<sup>75</sup>. Parece existir una correlación inversa entre la frecuencia y duración de la lactancia materna y el desarrollo de la enfermedad<sup>76</sup>. El inicio clínico no se atribuye al papel protector de la lactancia

materna, sino a una temprana exposición a las proteínas de la leche de vaca que se acentúa a edades más tempranas. Un elevado consumo de leche de vaca correlaciona positivamente con la aparición de autoanticuerpos asociados a DT1<sup>77</sup>. En niños con DT1 existe un aumento de los niveles de anticuerpos contra componentes de la leche de vaca que no se han detectado contra otros antígenos dietéticos como la ovoalbúmina<sup>78</sup>. Se ha observado un aumento de la respuesta T contra la albúmina sérica bovina (BSA), el fragmento ABBOS de la BSA (aminoácidos 152-168) y la beta-caseína<sup>61</sup>, componentes de la leche de vaca.

➤ *Gluten*

El incremento en la dieta de gluten o proteínas derivadas ha implicado un aumento en la incidencia de la enfermedad en modelos animales de DT1<sup>79,80</sup>. En el estudio prospectivo BABYDIAB se ha hecho un seguimiento a hijos de padres diabéticos desde el nacimiento hasta los 11 años de vida<sup>81</sup>. Se ha determinado que en estos niños, la introducción del gluten en la dieta antes de los 3 meses de vida, incrementa 5 veces el riesgo de desarrollar anticuerpos contra islote<sup>82</sup>. Existe cierta reactividad de las células T hacia el gluten en pacientes de diagnóstico reciente de DT1<sup>83</sup>. Por otro lado, la prevalencia de enfermedad celíaca en niños con DT1 es elevada<sup>84</sup>.

➤ *Grasas*

Existen pocos estudios sobre la implicación del consumo de grasas en el desarrollo de DT1, pero la tendencia es que una dieta rica en ácidos grasos insaturados aportaría más radicales libres a los que las células beta son muy sensibles y por el contrario dietas ricas en antioxidantes, como la vitamina E, prevendrían el desarrollo de la enfermedad<sup>85</sup>.

➤ *Café, té*

El consumo elevado de café, té o algún factor relacionado por niños susceptibles a desarrollar DT1 podría aumentar el riesgo de padecer la enfermedad<sup>86</sup>. Se han hecho estudios retrospectivos del consumo de té y café por mujeres durante el embarazo, pero el efecto '*in utero*' no se ha podido demostrar.

➤ *Zinc*

El zinc es un nutriente esencial que se encuentra en elevadas concentraciones en los gránulos secretores de las células beta y que se ha demostrado que tiene propiedades coadyuvantes a la insulina<sup>87</sup>. El suplemento en la dieta con zinc, disminuye la severidad de la insulinitis y la incidencia de diabetes en la rata BB. Un estudio sugiere que áreas geográficas con una concentración de zinc mayor en el agua de bebida, presentan una incidencia menor de la enfermedad, confiriendo al zinc un efecto protector<sup>88</sup>. Se postula que la deficiencia de zinc aumenta el riesgo de padecer diabetes porque dificulta la síntesis de CuZn superóxido dismutasa, implicada en la protección contra radicales libres de oxígeno<sup>89</sup>.

➤ *Vitamina D*

Se ha descrito que la administración de vitamina D, previene el desarrollo de DT1 en el modelo espontáneo de DT1 *nonobese diabetic* (NOD)<sup>90</sup>. Un estudio multicéntrico a nivel europeo (EURODIAB) ha descrito que la suplementación de la dieta con vitamina D a edades muy tempranas, se asocia a una disminución del riesgo de desarrollar diabetes<sup>91</sup>.

➤ *Composición de la dieta infantil*

La elevada frecuencia de consumo de alimentos ricos en carbohidratos en niños de menos de 10 años y de proteína en niños de más de 10 años, aumenta el riesgo de padecer la enfermedad<sup>92</sup>

### **2.4.2.3 Patógenos y vacunas**

En modelos animales se ha demostrado que la presencia de patógenos disminuye drásticamente la incidencia de la enfermedad<sup>93,94</sup>. La hipótesis de la higiene surgida a partir de los años 60, relaciona el aumento de alergias y autoinmunidad en países desarrollados con la disminución de infecciones en los dos primeros años de vida debido a las pautas vacunales<sup>95</sup>. Se postula que las infecciones infantiles ‘educan’ al sistema inmune en cómo reaccionar ante cambios antigénicos y en países industrializados esta ‘educación’ se ha

reducido de forma que el sistema inmune se activa frente a sustancias inocuas<sup>96</sup>. Esta teoría no se ha podido demostrar con evidencias directas.

En esta línea, diversos estudios demuestran una correlación inversa entre las parasitaciones con helmintos a determinadas edades y el desarrollo de alergias, autoinmunidad en general y DT1 en particular<sup>97,98</sup>. Los mecanismos propuestos son: a) los helmintos y sus productos interactúan con DC y linfocitos B induciendo la producción de IL-10 de forma que se producen células reguladoras capaces de inhibir la actividad de células Th1 y Th2, y b) helmintos y sus productos interactúan con DC de forma que sus antígenos son presentados a células NKT a través de CD1d promoviendo su expansión de forma que las respuestas Th1 polarizan a Th2.

El propósito de las vacunaciones es inducir inmunización frente a antígenos determinados. Las vacunas frecuentemente no sólo incluyen los antígenos específicos frente a los que se pretende inmunizar, sino que contienen también adyuvantes. Estas sustancias se incluyen para potenciar la respuesta inmune hacia ciertos antígenos, pero la respuesta es inespecífica. Aunque se han publicado numerosos casos de síndromes autoinmunes post-vacunales, son efectos temporales relacionados con la vacuna específica<sup>99</sup>. Las vacunaciones de pacientes con enfermedades autoinmunes diagnosticadas no ha determinado un aumento de los síntomas y han tenido una respuesta humoral correcta. No existen datos concluyentes que relacionen las pautas vacunales con el aumento de riesgo de DT1: los resultados de diferentes estudios epidemiológicos son contradictorios<sup>100,101</sup>. En cambio, las inmunizaciones han servido para disminuir el riesgo de diabetes causada por la infección con el virus de la rubeola<sup>102</sup>.

Las infecciones víricas como factor ambiental en el desarrollo de la DT1 se desarrolla en el punto 3.

#### **2.4.2.4 Factores de riesgo antenatales**

Se ha postulado que los procesos patogénicos que conduciría a la DT1 podrían comenzar *'in utero'*. Algunos de los factores que podrían influir son: infecciones maternas con enterovirus<sup>103</sup> e incompatibilidad de grupo sanguíneo materno-fetal<sup>104</sup>.

#### **2.4.2.5 Toxinas, fármacos y/o productos químicos**

Se ha descrito que la bafilomicina A1, un antibiótico macrólido producido por *Streptomyces ssp*, induce la enfermedad en ratón<sup>105</sup>. Dado que numerosos tubérculos de consumo habitual pueden estar contaminados con *Streptomyces ssp*, la ingesta de elevadas concentraciones de esta toxina podría ser una causa potencial de DT1. En modelos animales se puede inducir la enfermedad mediante la administración de sustancias como el aloxano o la estreptozotocina (ver apartado, 5.2.1 Modelos inducidos farmacológicamente). En diferentes estudios epidemiológicos se ha demostrado que niveles elevados de nitritos o nitratos en la dieta, a partir de los cuáles se pueden formar compuestos N-nitroso, aumenta el riesgo de DT1<sup>106,107</sup>.

#### **2.4.2.6 Factores psicológicos**

Algunos estudios indican que situaciones estresantes pueden preceder al inicio clínico de la enfermedad<sup>108</sup> y que situaciones estresantes mantenidas durante los primeros años de vida podrían aumentar el riesgo de DT1 por afectación de la respuesta inmune<sup>109</sup>. El estrés puede afectar a los niños a través de la conexión que existe entre los niveles hormonales (aumento de la concentración de cortisol y catecolaminas) y las señales nerviosas que influyen por un lado la sensibilidad y la necesidad de insulina y por otro al sistema inmune<sup>110</sup>. Un estrés mantenido parece estar implicado en la inducción o progresión de la diabetes autoinmune en niños durante el primer año de vida.

#### **2.4.2.7 Factores estocásticos**

Los millones de linfocitos presentes en el organismo poseen especificidades diferentes de receptores de antígenos<sup>3</sup>. El conjunto constituye el repertorio de receptores de antígeno del individuo y se genera por reordenamiento de genes somáticos al azar. Los receptores están codificados por conjuntos de segmentos génicos que se unen a los otros mediante un proceso irreversible de recombinación de ADN conocido como recombinación somática. Este mecanismo genético que tiene lugar durante el desarrollo linfocitario en timo y médula ósea, generará miles de variantes de genes que codifican para los diferentes receptores. Al ser este un mecanismo al azar, cada individuo es portador de un repertorio diferente que determinará, entre

otras, diferencias en el número de células autoreactivas o reguladoras. Este hecho, determinará mayor o menor susceptibilidad a ciertas enfermedades autoinmunes y explicaría en parte, por qué no todos los individuos de una cepa consanguínea susceptible a una enfermedad la desarrollan.

## **2.5. Patogénesis**

El estudio de la patogénesis de esta enfermedad es complicado en humanos por un lado, por el largo periodo asintomático que precede al inicio clínico que puede durar de meses a años y por otra parte, debido a la dificultad de acceder al órgano diana. Muchos de los datos que se conocen actualmente sobre la patogénesis de la DT1 son extrapolaciones de estudios en modelos animales.

En la patogénesis de esta enfermedad, clásicamente se han determinado cinco etapas<sup>111,112</sup> (**Figura 5**):

### *1) Susceptibilidad genética*

La predisposición genética es determinante: polimorfismos en los genes de MHC y otros loci, contribuyen al desarrollo de la enfermedad tanto en humanos como en modelos animales (ver apartado, 2.4.1 Susceptibilidad genética).

### *2) Desencadenante*

Uno o diversos factores no genéticos, principalmente en individuos genéticamente predispuestos, podrían actuar de desencadenante/s del proceso inmuno-mediado frente a la célula beta. Es importante tanto el momento del desarrollo en que estos factores actúan, como la cantidad de exposición y la diversidad de desencadenantes actuando al mismo tiempo. La caracterización de estos factores es de gran interés para estrategias de prevención de la enfermedad.

### *3) Autoinmunidad*

Los primeros 'marcadores' de autoinmunidad detectables, son los autoanticuerpos frente a la célula beta, que aparecen en la fase prediabética y pueden mantenerse meses o años antes del inicio clínico. En estudios



realizados en diferentes países con técnicas cuantitativas de gran especificidad y sensibilidad<sup>113</sup>, se han determinado las frecuencias de los autoanticuerpos más útiles como marcadores en humano:

- Autoanticuerpos contra islotes (*islet cell antibodies*, ICAs): fueron los primeros anticuerpos relacionados con DT1 descritos en 1974<sup>114</sup>. Reaccionan contra componentes citoplasmáticos del islote. Se detectan en un 70-90% de los pacientes al inicio de la enfermedad y la frecuencia disminuye después del diagnóstico de forma que después de 10 años sólo un 5-10% de los pacientes son ICA positivo. Se realiza una determinación semicuantitativa, ya que la técnica consiste en determinar la reactividad de un suero frente a secciones congeladas de páncreas humano normal del grupo sanguíneo O. La expresión cuantitativa se expresa en unidades JDF. Se sabe que la tinción para ICA marca GAD-65 e IA-2 así como otras moléculas, pero no insulina<sup>115</sup>.
- Autoanticuerpos contra insulina (IAAs): se detectan en un 43-69% de pacientes al inicio de la enfermedad. Son más comunes en niños que en adultos y existe una correlación inversa con la edad: a menor edad, más porcentaje de IAAs. Estos autoanticuerpos se encuentran a menudo asociados a la presencia de algún otro (insulina y/o GAD).
- Autoanticuerpos contra GAD (GADAs): se detecta en un 52-77% de los pacientes al inicio de la enfermedad. Existen dos isoformas de GAD, GAD65 y GAD67, que además de expresarse en los islotes se encuentra en cerebro, ovarios y testículos. La mayoría de sueros de pacientes con DT1 sólo reacciona con GAD65<sup>116</sup>.
- Autoanticuerpos contra IA-2 (IA-2As): se detecta en un 55-75% de los pacientes al inicio de la enfermedad.

Se ha determinado que el 95% de los individuos prediabéticos o los diabéticos al inicio de la enfermedad, expresa al menos uno de los autoanticuerpos frente al 3% de la población control<sup>117</sup>. La presencia de un solo

anticuerpo se asocia a un modesto riesgo a desarrollar la enfermedad (20%) mientras que la presencia de dos o más autoanticuerpos implica un riesgo a desarrollar la enfermedad mucho mayor: el 75% de los individuos que presentan dos o más autoanticuerpos desarrolla la enfermedad en un seguimiento de diez años.

En el ratón, aunque existe cierta controversia, el único autoanticuerpo específico detectado mediante radioinmunoensayo (RIA), reacciona frente a insulina<sup>118</sup>.

#### *4) Disminución de la secreción de insulina*

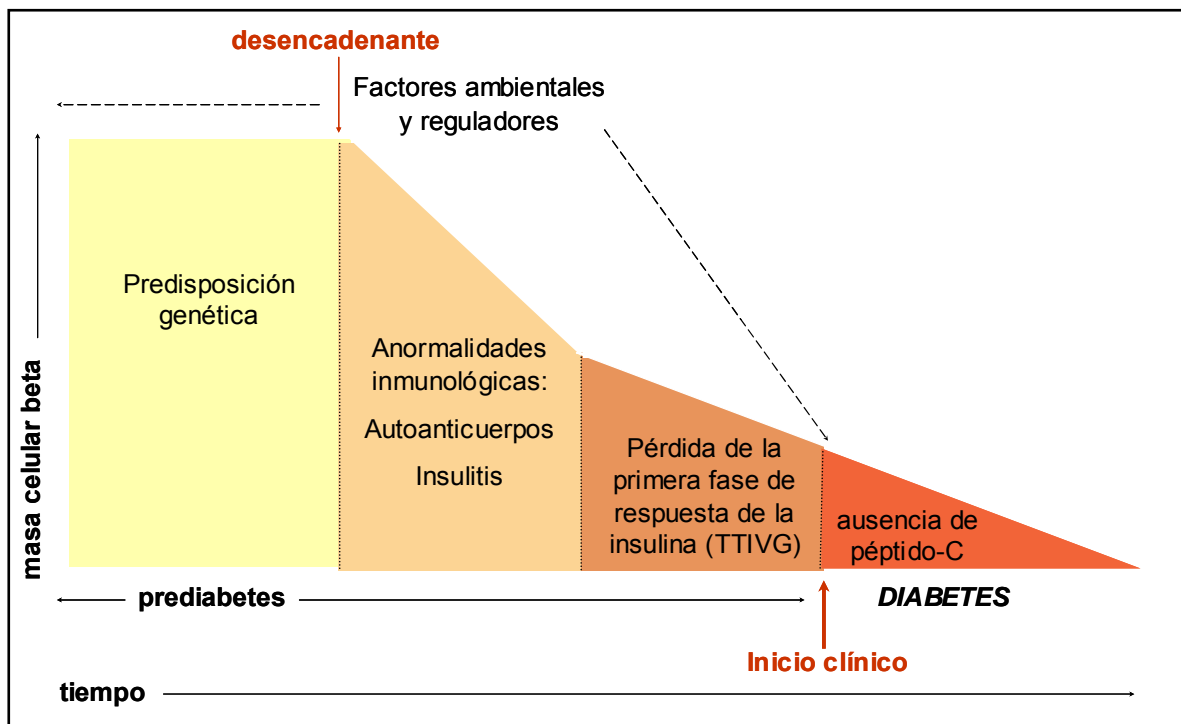
La primera evidencia de la disfunción de la masa celular beta la proporciona el test de tolerancia intra-venosa a la glucosa (TTIVG): se determina el contenido de insulina preformada en suero y la capacidad de secretarse en respuesta a un incremento agudo de glucosa plasmática. Se estima que cuando la respuesta de insulina en este test desciende, hay al menos un 50% de la masa celular beta afectada.

En el test de la tolerancia oral a la glucosa (TTOG) no sólo se tiene en cuenta el estímulo de los niveles plasmáticos de glucosa para estimular la secreción de insulina, sino que interviene también la estimulación de secreción a nivel del sistema nervioso autónomo y la secreción del péptido glucagón-like 1 en el intestino. El resultado del test es normal cuando los niveles de glucosa vuelven al estado basal normal durante las dos horas después del estímulo.

#### *5) Diabetes clínica*

La diabetes clínica muchas veces se manifiesta de forma aguda con un aumento de la glucosa plasmática. Los síntomas clásicos son: poliuria, polidipsia y pérdida de peso. Los datos más fiables para determinar la pérdida de masa celular beta suficiente para mantener la homeostasis glicémica, mediante métodos no invasivos, es el estudio de la secreción de insulina y péptido-C, que progresivamente van disminuyendo<sup>119</sup>. En el momento del diagnóstico, la mayoría de pacientes tienen cierta función beta residual, que es suprimida reversiblemente por lo elevados niveles de glucosa. Una vez se consigue la euglicemia –niveles normales de glucosa- las células beta residuales secretan insulina durante el periodo conocido como ‘luna de miel’.

En la mayoría de pacientes el proceso autoinmune continúa de forma que estas células residuales son destruidas<sup>120</sup> (**Figura 5**).



**Figura 5.** Patogénesis de la DT1

#### 6) Anatomía patológica del páncreas del paciente diabético

En humanos el seguimiento de progreso de la enfermedad es complicado por la dificultad de acceder al tejido diana: sólo se practican biopsias pancreáticas en Japón. En estos estudios de biopsias pancreáticas se ha documentado que los islotes de pacientes al inicio clínico de DT1, están infiltrados mayoritariamente por linfocitos T CD8 y presentan un número variable de linfocitos T CD4, linfocitos B y macrófagos<sup>121,122</sup>. Esta infiltración se correlaciona con la hiperexpresión de MHC de clase I en los islotes y endotelio e hiperexpresión de MHC de clase II y algunas moléculas de adhesión (*intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1 y *lymphocyte function-associated antigen-3*, LFA-3) en el endotelio pero no a nivel insular.

Las lesiones anatomopatológicas de páncreas de pacientes diabéticos fallecidos al inicio de la enfermedad son muy heterogéneas: la mayoría de islotes carecen de células beta pero no están infiltrados (islote pseudoatrófico), algunos islotes se conservan normales sin infiltrados y algunos conservan células beta pero están infiltrados<sup>123</sup>. En estas muestras se

han detectado citocinas como IFN de tipo 1 e IL-6 así como aumento en la expresión de HLA de clase I (pero no de clase II), ICAM-1, TAP-1 y Fas<sup>124,125,126</sup>. El mecanismo de destrucción propuesto, implica apoptosis mediada por Fas ya que esta molécula se ha detectado en las células beta pancreáticas de islotes infiltrados y las células infiltrantes expresaban Fas ligando<sup>127</sup>. La complejidad para estudiar en humanos los procesos locales que preceden a la diabetes clínica puede abordarse mediante el estudio de la enfermedad en modelos animales.

La secuencia de infiltración de los islotes (insulitis) ha podido ser estudiada mejor en modelos animales espontáneos de DT1<sup>128</sup>. Las células presentadoras de antígeno (células dendríticas y/o los macrófagos), son los primeros tipos celulares que llegan al islote pancreático. Las células B, que se encuentran en gran número en los islotes infiltrados, podrían tener también un papel importante como presentadoras de antígeno. Las células T activadas por las APC actúan como efectoras finales que destruyen a las células beta pancreáticas. La IL-12 secretada por los macrófagos podrían activar a los linfocitos T CD4 que producirán IL-2 e IFN-gamma, activando sí a los linfocitos CD8, efectores finales de la destrucción. Estos linfocitos citotóxicos, producen citocinas que podrían determinar la expresión de Fas en el islote y que las células beta se destruyeran vía apoptosis mediada por Fas y/o granzima y perforina. En algunos estudios se han observado también células NK en el infiltrado de estos animales y se ha relacionado con una insulitis más agresiva<sup>129</sup>.

Estudios tanto en humanos como en modelos animales, indican que las citocinas están implicadas en el desarrollo de DT1 a través de mecanismos directos, mediante citotoxicidad directa o mecanismos indirectos, modulando la activación, el *homing* y las funciones efectoras de las células inflamatorias<sup>130</sup>. Diversos estudios indican que las células Th1 y sus citocinas están implicadas en el inicio y progresión de la enfermedad: la transferencia adoptiva de células Th1 diabéticas a ratones SCID induce diabetes<sup>131</sup>, la enfermedad se previene por la expresión selectiva en células beta o el tratamiento con citocinas Th2<sup>132,133</sup> y las citocinas Th1 inducen la activación y expansión de células T autoreactivas<sup>134</sup>. Recientemente se ha propuesto mecanismos por los que las citocinas Th2 estarían implicadas, no directamente en la destrucción

autoinmune pero sí en la aceleración de la autoinmunidad contra la célula beta al inicio del proceso, principalmente IL-10<sup>135,136</sup>.

### 7) Autoantígenos

Los antígenos son moléculas que portan una serie de determinantes antigénicos, denominados epitopos, que son reconocidos por los anticuerpos y TCRs del sistema inmune adaptativo y pueden iniciar una respuesta inmune<sup>1</sup>. La mayoría son ajenos al individuo, pero cuando un componente del propio organismo es reconocido por componentes del sistema inmune adaptativo dando lugar a una respuesta autoinmune, se denomina autoantígeno. Tanto en humanos como en ratones se han identificado numerosos antígenos y epítotos insulares frente a los que responden clones de linfocitos T CD4 o CD8 autoreactivos<sup>137,138</sup> (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Autoantígenos pancreáticos frente a los que responden clones de linfocitos CD4 y/o CD8

CLON DE LINFOCITO	HUMANO	RATÓN
CD4	Cadena B de la insulina Proinsulina GAD65 GAD67 IA-2 Hps60 Imogen38	Cadena B de la insulina Preproinsulina I Preproinsulina II Proinsulina IA-2 GAD65 Hps60 Fogrina (IA-2β)
CD8	GAD65 Cadena B de la insulina PreproIAPP	IGRP Cadena B de la insulina GAD65

### 2.6 Criterios diagnósticos

Existen tres métodos para el diagnóstico de diabetes<sup>47</sup> pero cada uno ha de ser confirmado con alguno de los otros dos en días posteriores:

- 1) Síntomas de diabetes (poliuria, polidipdia y pérdida de peso) más aumento casual (sin tener en cuenta cuándo fue la última comida) de la glucosa plasmática  $\geq 200$  mg/dl (11,1 mmol).
- 2) Glucosa plasmática en ayuno  $\geq 126$  mg/dl (7 mmol). Ayuno implica como mínimo ocho horas sin ingesta calórica.

3) Glucosa plasmática  $\geq 200$  mg/dl (11,1 mmol) dos horas después del test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG): administración del equivalente a 75 gramos de glucosa anhidra disuelta en agua.

## **2.7 Tratamiento de la DT1**

Los tratamientos de la DT1 consisten en la administración exógena de insulina, para suplir la carencia, o en la restauración de su producción. Las terapias pretenden eliminar la hiperglucemia y evitar la cetoacidosis. A largo plazo, el objetivo es evitar la aparición y evolución de las complicaciones crónicas de la enfermedad.

### **2.7.1 Administración exógena de insulina**

En 1921 se describió el efecto hipoglucemiante de extractos pancreáticos de perros por parte de N. Paulesco y F.G. Banting. A estos extractos, purificados en 1922 por F.G. Banting y C.H. Best, se dió el nombre de insulina, y se administraron con éxito a pacientes diabéticos. Antes de la década de los 80 se purificaban insulinas bovinas y porcinas pero gracias a las técnicas de recombinación genética, actualmente se dispone de insulinas química y estructuralmente idénticas a la humana. En la actualidad, la administración de insulina exógena es la terapia más universal para el tratamiento de la DT1. Los preparados de insulina se clasifican en función de la velocidad y duración de la acción después de su administración subcutánea: rápida, intermedias y lentas<sup>139</sup>. La potencia se expresa en unidades internacionales por mililitro (UI/ml) donde una UI equivales a 36 microgramos de insulina. La duración de la acción no sólo depende del tipo de insulina sino de la absorción que puede ser muy variable: existe un 30% de variación individual y un 50% interindividual, en función del lugar de inyección, temperatura, dosis administrada, concentración del preparado (a más diluida mejor se absorbe), el grado de hiperglucemia y el ejercicio físico. La pauta de administración dependerá de cada paciente. Las pautas que más se asemejan a lo que ocurre fisiológicamente combinan inyecciones múltiples de insulina rápida antes de cada comida con insulinas lentas o intermedias como base<sup>140</sup>.

Para la administración del fármaco en la actualidad se utilizan jeringas, lapices inyectoros o bombas de infusión que pueden ser subcutáneas o

intraperitoneales. El tratamiento prolongado con insulina presenta a veces efectos colaterales, como la aparición de IAA que pueden unirse a la insulina absorbida y dificultar su acción. Otras complicaciones por el tratamiento con insulina incluyen: reacción dérmica por administración de la hormona en la dermis, la lipohipertrofia o acúmulo de tejido graso en áreas donde se administra repetidamente la insulina debido a un efecto lipogénico de la misma, lipoatrofia o desaparición del tejido graso subcutáneo de ciertas áreas del cuerpo por alergia local a la insulina e infecciones en las zonas de inyección<sup>141</sup>.

### **2.7.2 Análogos de la insulina**

La insulina humana recombinante puede ser modificada para mejorar sus propiedades farmacocinéticas<sup>142</sup>. Así se han creado análogos de la insulina que se absorben de forma más rápida y disminuyen la variabilidad de absorción que muestra la insulina.

### **2.7.3 Transplante de páncreas entero o islotes pancreáticos**

Aunque el transplante se considera una de las opciones válidas para el tratamiento de la DT1, hay que considerar que los pacientes sometidos a estas terapias requieren un tratamiento inmunosupresor de por vida, no sólo para evitar el rechazo del injerto sino también para bloquear la recurrencia del ataque autoinmune a los islotes<sup>112</sup> y existe el problema de la disponibilidad de donantes.

#### **2.7.3.1 Páncreas entero**

El primer transplante de páncreas se realizó en 1966 por W. Nelly y R. Lillehei y fue un doble transplante de riñón y páncreas<sup>143</sup>. Aunque los injertos funcionaron de forma inmediata, fueron rechazados por no administrar terapia inmunosupresora. Actualmente esta técnica está indicada en pacientes que debido a las complicaciones derivadas de la diabetes tienen una grave afectación renal, por lo que en muchos casos esta técnica se utiliza cuando hay que hacer al mismo tiempo un transplante renal<sup>144</sup>. El páncreas se conecta directamente al intestino por anastomosis y se han documentado supervivencias del injerto superiores a 5 años<sup>145</sup>. Se considera una técnica quirúrgica más agresiva, pero a la vez más eficaz que el transplante de islotes

en términos de una función endocrina más efectiva y la necesidad de un sólo donante para establecer la independencia insulínica<sup>146</sup>.

### **2.7.3.2 Islotes pancreáticos**

El trasplante de islotes supone una técnica quirúrgica menos agresiva que el trasplante de páncreas entero y sólo se sustituye el tejido afectado. Los primeros trasplantes isogénicos se realizaron en ratas en el hígado, a través de la vena porta. Los animales pancreatomizados normalizaban el nivel de glucosa en sangre<sup>147</sup>. Los primeros trasplantes de islotes en humanos con independencia insulínica se llevan a cabo en 1980 cuando se transplantan a una paciente diabética durante 20 años, 200.000 islotes mediante inyección intraesplénica junto con un riñón<sup>148</sup>.

En 1988, C. Ricordi describió un método semiautomático para el aislamiento de islotes pancreáticos humanos<sup>149</sup>. Este método consistía en la digestión de páncreas con colagenasa y agitación mecánica en una cámara con bolas de cristal o aluminio. Esta cámara disponía de una malla para separar los islotes junto con el tejido exocrino que se iban digiriendo. Más tarde al método original se añadió una purificación mediante gradientes de densidad lo que mejoró la pureza de los islotes<sup>150</sup>, aunque redujo el rendimiento total de la técnica.

En el denominado Protocolo de Edmonton se ha aplicado una terapia inmunosupresora sin corticosteroides ni ciclosporina (diabetógenos) y se han aplicado mejoras en las técnicas de aislamiento de los islotes, como el uso de soluciones de colagenasa con bajos niveles de endotoxina<sup>151</sup>. Todo esto ha supuesto una mejora en la supervivencia y función del implante. Son necesarios un mínimo de dos trasplantes: después del primer trasplante la dosis de insulina se reduce hasta mitad, pero es necesario un segundo trasplante para alcanzar 9000 equivalentes de islote (EI)/kg de peso del receptor y conseguir la independencia insulínica<sup>152,153</sup>. El 80% de los pacientes transplantados con el Protocolo de Edmonton mantienen la independencia insulínica al cabo de un año. Este porcentaje disminuye hasta un 60% después de dos años del trasplante. En los pacientes que no existe una independencia



insulínica, se obtienen beneficios a nivel del metabolismo de lípidos, proteína y glucosa.

Esta técnica presenta ciertas limitaciones:

- Número de islotes. Para conseguir la independencia insulínica es importante transferir más de 9000 EI/kg de peso del receptor, lo que supone realizar un mínimo de dos trasplantes y por consiguiente un donante diferente en cada caso<sup>154</sup>.
- Estado del tejido tras la digestión. Durante este proceso los islotes están expuestos a una solución de colagenasa, un gradiente de ficoll y un estrés mecánico, lo que puede disminuir la viabilidad del implante debido a su estado inflamatorio<sup>155</sup>. Para optimizar la calidad del tejido después del protocolo de aislamiento se están estudiando mejoras en el protocolo como: el uso de antioxidantes para reducir el estrés oxidativo<sup>156</sup>, el uso de inhibidores de proteasas para evitar una excesiva digestión enzimática<sup>157</sup> y mejorar las técnicas de obtención del páncreas para reducir el tiempo de isquemia caliente que afecta a la viabilidad funcional de los islotes<sup>158</sup>.
- Mantenimiento del órgano a procesar. Se ha descrito que es importante el procesamiento del páncreas en un tiempo inferior a 8 horas. El mantenimiento del órgano previo al aislamiento de los islotes ha dado muy buenos resultados con el método de las dos capas, que consiste en mantener el páncreas continuamente oxigenado mediante flotación en una interfase de dos fluidos de diferente densidad<sup>159</sup>.
- Localización del injerto. En la actualidad la mayoría de trasplantes se realizan intrahepáticamente a través de la vena porta. Se sigue experimentando para encontrar un lugar de fácil acceso, con buena oxigenación y vascularización y que sea inmunológicamente privilegiado<sup>160</sup>.

En el futuro, para que el trasplante de islotes sea una terapia de elección, habría que: optimizar las técnicas de aislamiento de islotes, mejorar

las terapias inmunosupresoras o técnicas de tolerancia al implante, estandarizar los protocolos de trasplante y establecer bancos de islotes preservados para disponer del número adecuado, así como solucionar el problema de la recurrencia de la enfermedad.

#### **2.7.4 Otras estrategias terapéuticas: Terapia génica y células pluripotenciales**

Los avances en biología molecular y los estudios sobre células troncales abren nuevas perspectivas para futuras estrategias para el tratamiento de la DT1. En particular, se podría conseguir la restauración de la secreción de insulina por terapia génica o sustitución celular.

La terapia génica consiste en introducir el gen de la insulina en cualquier tipo celular del organismo para producir insulina<sup>161,162,163</sup>. Para el éxito de esta técnica es importante disponer de los siguientes componentes<sup>164</sup>: 1) un sistema efectivo de transferencia génica, 2) un sistema regulador que permita la expresión y secreción de insulina en respuesta a glucosa y otros nutrientes, 3) un sistema apropiado para el procesamiento de preproinsulina a insulina activa en las células transfectadas y 4) células diana con características similares a las células beta pero que no sean la diana del ataque autoinmune. Existen dos estrategias para la terapia génica<sup>165</sup>: 1) método *ex vivo*, el tejido se extirpa del paciente, se transduce con el gen terapéutico *in vitro* y se vuelve a transplantar y 2) método *in vivo*, el vector para la terapia génica se administra directamente al paciente. Para el éxito de esta última técnica es necesario el desarrollo de vectores más seguros y efectivos.

La terapia mediante sustitución celular consiste en implantar células productoras de insulina en pacientes con DT1<sup>161</sup>. Las células transferidas pueden ser células beta expandidas *in vitro* o células madre pluripotenciales de embriones o adultos, que pueden diferenciarse en un número determinado de tipos celulares<sup>166</sup>. En la actualidad, se están haciendo grandes avances en el estudio sobre células pluripotenciales y los resultados son esperanzadores ya que se ha podido conseguir islotes o células insulares a partir de células embrionarias murinas<sup>167,168</sup>, células embrionarias humanas<sup>169</sup> y células ductales de páncreas humano adulto<sup>170</sup>. La ventaja de esta técnica es que a partir de células autólogas podrían producirse células beta, por tanto podría evitarse el

rechazo aunque seguiría existiendo el riesgo de un ataque inmune recurrente<sup>171</sup>.

## **2.8 Complicaciones**

La hiperglicemia mantenida, puede causar a largo plazo daño, disfunción y el fallo de diferentes órganos<sup>47</sup>: aumento del riesgo de infecciones; retinopatías que pueden derivar en ceguera; nefropatía que puede dar lugar a un fallo renal; neuropatías periféricas que producen úlceras en los pies con riesgo de amputación y articulaciones de Charcot; neuropatías del sistema nervioso autónomo que causan disfunciones gastrointestinales, genitourinarias, disfunción sexual y síntomas cardiovasculares. Los pacientes con diabetes tienen un riesgo elevado de sufrir enfermedades cerebrales y cardiovasculares, hipertensión y enfermedad periodontal.

## **2.9 Prevención de la DT1**

En la actualidad mediante la detección de marcadores inmunológicos y de factores de riesgo, se pueden identificar los familiares de primer orden de pacientes diabéticos que con elevada probabilidad desarrollaran la enfermedad<sup>172</sup>. Aunque se recomienda determinar el riesgo relativo a padecer la enfermedad en familiares de primer grado de pacientes, sólo un 15% de los casos de nuevo diagnóstico tienen antecedentes familiares de la enfermedad<sup>112</sup>. Sin embargo, en la actualidad no existe ninguna estrategia capaz de prevenir de forma efectiva la enfermedad. Los diferentes estudios con el objetivo de prevenir el desarrollo de DT1 en personas a riesgo se pueden clasificar en: prevención primaria, cuyo objetivo es eliminar los factores ambientales relacionados con la enfermedad y detener el proceso autoinmune presente y prevención secundaria, que pretende preservar la función de las células beta residuales y la producción de insulina endógena en pacientes de nuevo diagnóstico de DT1.

### **2.9.1 Prevención primaria**

Los proyectos de prevención primaria se basan en resultados de estudios con modelos animales y en experiencias piloto en humanos:

1) *Diabetes Prevention Trial* (DPT-1) en Estados Unidos<sup>173</sup>

El objetivo de este estudio de prevención primaria era determinar si la administración de dosis bajas de insulina administradas de forma parenteral u oral, podría prevenir o retrasar el desarrollo de la enfermedad en individuos de riesgo elevado. Se determinó la presencia de ICAs a familiares de primer grado de individuos diabéticos. A los sujetos positivos se les determinó también la presencia de IAAs y se les realizó un TTIV a la glucosa para analizar la función celular beta residual. Según los resultados, estos individuos se estratificaron en tres categorías de riesgo:

- bajo, <25% de probabilidad de desarrollar diabetes en 5 años
- intermedio, 25 a 50% de probabilidad de desarrollar diabetes en 5 años
- elevado, >50% de probabilidad de desarrollar diabetes en 5 años

A individuos de riesgo elevado se les administró dosis bajas de insulina parenteral o placebo. No hubo diferencias en la incidencia de la enfermedad (60%) entre grupos ni tampoco un retraso en la aparición de los signos clínicos. La administración de insulina oral en individuos de riesgo moderado (25-50%) tampoco afectó a la ratio de desarrollo de la enfermedad siendo de un 9% anual tanto en individuos tratados como placebo<sup>120</sup>.

## 2) *The European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT)*<sup>174</sup>

La nicotinamida es una vitamina del grupo B derivada del ácido nicotínico. Uno de sus efectos en el sistema inmune es la inhibición de la muerte celular beta inducida por macrófagos. El objetivo de este estudio de prevención primaria es determinar si la administración de nicotinamida, una vitamina del grupo B derivada del ácido nicotínico, previene o retrasa la aparición de diabetes en familiares de individuos con T1D positivos para ICAs. En este ensayo, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo placebo y el control a la dosis de nicotinamida usada<sup>175</sup>.

## 3) *Trial to Reduce IDDM in the Genetically at Risk (TRIGR)*<sup>176</sup>

Los datos existentes en numerosos estudios epidemiológicos y estudios en modelos animales sirvieron de base para el estudio piloto de eliminación de la leche de vaca de la dieta en niños de menos de seis meses de vida. Se hicieron dos grupos en familiares de primer grado de niños diabéticos con susceptibilidad genética: a unos se dio dieta estándar y a otros preparados

hidrolizados de caseína. Los estudios preliminares muestran una disminución de autoanticuerpos en el grupo alimentado con fórmulas hidrolizadas<sup>177</sup>.

4) Otros estudios de prevención primaria<sup>120</sup>:

- Tres centros en Finlandia y uno en Australia están estudiando el efecto de la insulina administrada de forma intranasal en individuos con riesgo genético e inmunológico a padecer DT1.
  
- Los estudios sobre una vacuna oral basada en GAD está en fase dos y se está probando e individuos adultos con LADA.

### **2.9.1 Prevención secundaria**

Se han utilizado numerosas terapias en individuos de nuevo diagnóstico de DT1 para preservar la función de las células beta residuales<sup>120</sup>: plasmaféresis, dieta sin gluten, inmunización con la vacuna del Bacillus Calmette-Guerin (BCG) y la fiebre Q, nicotinamida, ciclosporina A, azatioprina y corticosteroides. Aunque ninguna de estas terapias ha tenido éxito a largo plazo, el tratamiento con inmunosupresores en individuos al inicio de la enfermedad clínica, ha permitido la independencia de la insulina a la mitad de los pacientes tratados después de un año<sup>178</sup>.

Se han publicado estudios preliminares de prevención secundaria en los que se han obtenido resultados prometedores, aunque es necesario ampliarlos:

1) Administración de DiaPep277

El DiaPep277 es un péptido derivado de la Hsp60. Cuando se inyecta tres veces subcutáneamente a individuos de reciente diagnóstico, al cabo de diez meses de seguimiento, se observa un aumento de los niveles de C-péptido y una disminución de los requerimientos de insulina en los individuos tratados respecto a los que se ha administrado placebo<sup>179</sup>.

2) Administración de anti-CD3

La administración intravenosa de un anticuerpo monoclonal modificado anti-CD3 (ala-ala hOKT3), diseñado para reducir la secreción de citocinas de las células T, mantiene los niveles de C-péptido o los aumenta en pacientes

tratados respecto a los controles, como mínimo hasta doce meses después de la administración<sup>180</sup>.

Recientemente, en un estudio multicéntrico, la administración de un anticuerpo monoclonal contra CD3 (ChAglyCD3) durante 6 días consecutivos después del diagnóstico de DT1, se ha relacionado con una conservación de la función residual beta a los 18 meses de seguimiento<sup>181</sup>.

Además, existen dos redes de cooperación internacional entre grupos de investigación clínicos, relacionados con la prevención de la enfermedad:

1) *The Type 1 Diabetes TrialNet* ([www.diabetestrialnet.org](http://www.diabetestrialnet.org)) cuyo objetivo principal es el desarrollo de protocolos de prevención primaria y secundaria para la DT1.

2) *The Immune Tolerance Network* ([www.immunetolerance.org](http://www.immunetolerance.org)) cuyo objetivo es el desarrollo de nuevas terapias para el mantenimiento de la tolerancia en enfermedades inmunomediadas, incluyendo la DT1.

En la actualidad, grupos de investigación de todo el mundo están trabajando, principalmente con modelos animales, para esclarecer los mecanismos fisiopatológicos de la DT1 y para así diseñar estrategias de prevención más efectivas.

### **3. Virus y diabetes tipo 1**

Entre los factores ambientales que se han relacionado con el desarrollo de DT1 cabe destacar la posible etiología vírica. Aunque hasta la fecha, sólo se ha conseguido aislar una vez un virus (una variante del virus coxsackie B4) del páncreas de un paciente diabético<sup>182</sup>, evidencias indirectas apoyan esta hipótesis: incidencia estacional de la enfermedad, siendo más frecuente en otoño e invierno<sup>183</sup>; la presencia de IgM específicas para algunos virus en el suero de pacientes de nuevo diagnóstico<sup>184</sup>; la detección de IFNs de tipo 1 (citocinas antivirales) en páncreas de pacientes diabéticos<sup>124,125,185</sup>, la presencia de RNA de enterovirus en el suero de pacientes diabéticos<sup>186</sup> y datos de estudios en modelos animales experimentales.

### **3.1 Virus implicados en el desarrollo de diabetes**

Hasta el momento se han asociado de forma indirecta los siguientes virus al desarrollo de diabetes tipo 1 en humanos y en diferentes especies animales:

#### *1) Virus de la rubeola*

El síndrome congénito de la rubeola (SCR) proporciona uno de los más claros ejemplos de infecciones virales asociadas al desarrollo de DT1. Los pacientes que han padecido este síndrome tienen una frecuencia de diabetes superior a la media poblacional. En el 50-80% de los pacientes diabéticos afectados por SCR, se observa la presencia de anticuerpos contra islote o anticuerpos anti-insulina<sup>187</sup>. Estos enfermos presentan una frecuencia incrementada del alelo HLA-DR3 (que confiere susceptibilidad a DT1) y una disminución en la frecuencia del alelo protector HLA-DR2<sup>188</sup>. Las células T citotóxicas podrían reconocer al virus de la rubeola y al autoantígeno GAD65-67 por un mecanismo de mimetismo molecular<sup>189</sup>. Este hecho sugiere que en individuos susceptibles, el SCR podría originar células T específicas de antígeno que por mimetismo molecular o por dispersión del antígeno resulta en la destrucción de las células beta. Las vacunaciones han servido para disminuir el riesgo de diabetes causada por la infección con este virus<sup>102</sup>.

Existe un estrecho paralelismo entre lo que ocurre en el hámster dorado sirio y el SCR en humanos: hámsters neonatales infectados con el virus de la rubeola presentan insulinitis, presencia de antígenos virales en las células beta pancreáticas y autoanticuerpos contra el citoplasma insular<sup>190</sup>.

#### *2) Enterovirus*

Los enterovirus (EV) se ha dividido en cuatro subgrupos en función de la variedad de hospedadores y patogenicidad: poliovirus, virus coxsackie A, virus coxsackie B y ecovirus. Los EV se encuentran en el tracto gastrointestinal y es en el intestino delgado donde más se replican. Datos epidemiológicos, serológicos y biológicos indican que los EV podrían estar implicados en el desarrollo de DT1<sup>191</sup>. Se han detectado anticuerpos y respuestas de células T frente a EV en pacientes de reciente diagnóstico<sup>192,193,194</sup>. Existen reacciones cruzadas de anticuerpos inducidos por la cápside viral con el autoantígeno IA-

2<sup>195</sup>. Se ha detectado un alta frecuencia de RNA enteroviral en pacientes con DT1 cuando se comparan con pacientes sanos<sup>196</sup>. Una variante del virus coxsackie B4 que fue aislada de un paciente con DT1 al inicio clínico, reprodujo la enfermedad en un modelo animal murino<sup>182</sup>. Este virus puede infectar células beta humanas *in vitro* produciendo una disminución de la producción de insulina a medida que aumenta la carga viral<sup>197</sup> e inducir la producción de citocinas proinflamatorias por parte de las células beta infectadas a través de una vía dependiente de TLR4<sup>198</sup>. Recientemente, se ha descrito la coincidencia en el inicio clínico de DT1 en miembros de la misma familia afectados por una infección enteroviral con tropismo por las células beta, lo que sugiere que el virus podría ser la causa de la DT1<sup>199</sup>. El proyecto EPIVIR en el norte de Europa, estudia la relación entre la incidencia de diabetes y las infecciones con enterovirus en diferentes países<sup>200</sup>. El estudio de la frecuencia de anticuerpos en países de incidencia alta y baja/media, indica que existe una correlación inversa entre la incidencia de DT1 y la infección con enterovirus. Por este motivo, se postula que las complicaciones derivadas de una infección enteroviral son más comunes en ambientes con una tasa baja de infecciones y sugieren que los EV podrían desencadenar el inicio clínico de la enfermedad.

### 3) *Retrovirus endógenos*

La mayoría de mamíferos contienen en su genoma secuencias retrovirales no infecciosas transmitidas verticalmente, que en el caso del genoma humano suponen un 1%. Algunas de estas secuencias pueden codificar para potentes superantígenos, que pueden estimular a un gran número de células T<sup>201</sup>. Se han relacionado retrovirus endógenos con el desarrollo de autoinmunidad aunque los mecanismos patogénicos se desconocen<sup>202</sup>. Más del 75% de los pacientes con autoanticuerpos contra insulina, presentan además anticuerpos que reconocen también al antígeno retroviral p73<sup>203</sup>. En 1994 se describió en dos pacientes diabéticos que el repertorio de linfocitos T a nivel de islote estaba enriquecido en la región variable Vβ7 y esto no ocurría a nivel periférico<sup>204</sup>. Este estudio no ha podido ser reproducido por otros autores. Más tarde, estos investigadores describieron un nuevo gen endógeno retroviral al que designaron como IDDMK<sub>1,2</sub>22 y donde identificaron un fragmento de una de sus proteínas como un superantígeno



(SAG) dependiente de MHC de clase II<sup>205</sup>. La expresión de este SAG a nivel extrapancreático implicaría una activación sistémica de células T autoreactivas que daría lugar a una destrucción autoinmunitaria de los islotes. Más recientemente, se ha descrito que la expresión génica defectiva del gen de un retrovirus, inducida por IFN-alfa, codificaría para un SAG estimulando de esta forma a los linfocitos T  $V\beta 7$  y dando lugar al desarrollo de DT1<sup>206</sup>. La expresión de retrovirus endógenos en las células beta pancreáticas, se ha relacionado con el desarrollo de insulinitis en el modelo NOD<sup>207</sup>.

#### 4) *Reovirus*

Este virus pertenece a la familia *Reoviridae* que comprende nueve géneros de los cuáles cuatro pueden causar enfermedad en el hombre: Ortoreovirus, Orbivirus, Coltivirus y Rotavirus. Se han detectado partículas virales de reovirus en el citoplasma de células beta en ratón, tras la inducción vírica de la enfermedad. No está claro si es debido a un efecto directo sobre la síntesis y secreción de insulina<sup>208</sup> o a un mecanismo autoinmune<sup>209</sup>. Las células beta humanas son susceptibles a la infección por rotavirus *in vitro*<sup>210</sup>. Algunos virus del género Rotavirus, contienen secuencias altamente similares a los autoantígenos GAD e IA-2, lo que sugiere un mecanismo patogénico por mimetismo molecular<sup>211</sup>.

#### 5) *Virus de las paperas*

Es uno de los primeros virus implicados en el desarrollo de diabetes, ya que se ha correlacionado positivamente el aumento en la incidencia de diabetes tras una epidemia de paperas<sup>212,213</sup>. Algunos niños afectados de paperas presentan ICAs y existen evidencias de que el virus puede inducir una respuesta autoinmune contra la célula beta o agravar un proceso autoinmune ya existente<sup>214</sup>. Las células beta humanas pueden infectarse por el virus de las paperas *in vitro*<sup>215</sup>.

#### 6) *Citomegalovirus*

La infección por citomegalovirus es común en humanos. Permanece latente y se activa en situaciones de inmunosupresión. Se ha correlacionado la detección de genoma viral específico de citomegalovirus con la presencia de

autoanticuerpos contra islote en pacientes diabéticos<sup>216</sup>. El mecanismo patogénico propuesto es de mimetismo molecular, ya que algunos autoantígenos diabetogénicos presentan reacciones cruzadas con el genoma viral<sup>217,218</sup>.

#### 7) *Virus de la Encefalomiocarditis*

Existen variantes diabetogénicas del virus de la encefalomiocarditis que producen destrucción autoinmune de las células beta del páncreas en función de la cepa de ratón y de la variante del virus<sup>219</sup>. Para el estudio de los mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad, se han establecido dos modelos<sup>220</sup>:

- 1) Infección de los animales con elevadas dosis de virus: causa la destrucción de la célula beta por un efecto citopático directo.
- 2) Infección de los animales con bajas dosis de virus: la infección activa a macrófagos insulares que secretan citocinas y producen radicales libres de oxígeno, esto resulta en la destrucción de la célula beta.

#### 8) *Kilham rat virus (KRV)*

La rata es el hospedador natural de este virus. La infección puede causar DT1 en cepas susceptibles y resistentes al desarrollo espontáneo de la enfermedad. No se han detectado partículas víricas en los islotes pero sí se produce insulitis<sup>221</sup>. Como el virus infecta órganos linfoides pero no a las células beta, se ha sugerido que el mecanismo patogénico podría ser debido a un desequilibrio Th1/Th2<sup>222</sup> donde tienen un papel importante los macrófagos y las citocinas secretadas<sup>223</sup>. Aunque se ha propuesto un mecanismo de mimetismo molecular en el que linfocitos T específicos para péptidos virales tendrían también especificidad por autoantígenos de la células beta, esta hipótesis no se ha acabado de confirmar ya que la administración de virus recombinantes que expresan péptidos del KRV, aunque activan linfocitos T virus específicos, no produce insulitis ni diabetes. Durante la infección con el KRV aumenta la proporción de linfocitos CD8 y la de CD4 Th1 mientras que disminuye la de CD4 Th2.

### 9) *Virus Epstein-Barr*

No existe una asociación muy marcada entre la infección por el virus Epstein-Barr y el desarrollo de DT1. Se ha publicado que una secuencia de la molécula HLA-DQ se repite 6 veces en un epítipo del virus. Los individuos que presentan esta secuencia en su MHC pueden tener reacciones cruzadas con el epítipo del virus. En algunos casos de infección aguda por el virus Epstein-Barr se han desarrollado anticuerpos contra este epítipo y también DT1<sup>224</sup>.

### 10) *Mengovirus*

En ratón produce encefalitis, pero hay una variante: Mengo-2T, que produce diabetes por necrosis de los islotes con infiltración severa, incluso en cepas resistentes a la infección por el virus de la encefalomiocarditis<sup>225</sup>.

### 11) *Virus de la diarrea viral bovina*

La infección por este virus se ha asociado al desarrollo de DT1 aunque no todos los individuos afectados desarrollen la enfermedad<sup>226</sup>. Se han detectado antígenos víricos en los islotes así como insulitis y una disminución en el tamaño y número de islotes<sup>227</sup>.

### 12) *Virus Ljungan*

Se ha aislado de topillos rojos silvestres (*Clethrionomys glareolus*)<sup>228</sup>. Estos animales en cautividad desarrollan diabetes con presencia de autoanticuerpos hacia GAD65, IA-2 e insulina y tinción positiva para las partículas víricas en los islotes. La infección experimental con el virus induce diabetes.

### 13) *Otros virus*

Otras evidencias circunstanciales apuntan a la relación entre el desarrollo de DT1 y otros virus<sup>229</sup>: virus de la hepatitis A, virus de la varicela, virus de la polio y virus de la gripe.

## **3.2 Mecanismos de acción**

Aunque los virus han sido ampliamente estudiados como uno de los factores ambientales más importantes para el desarrollo de DT1, los

mecanismos patogénicos por los que los virus causan destrucción de la célula beta, son poco conocidos<sup>229</sup>. Los mecanismos propuestos son:

- 1) Efecto citolítico directo por infección de las células beta pancreáticas
- 2) Inducción de una respuesta inmune específica contra célula beta:
  - a. Activación de macrófagos que producen mediadores solubles que son tóxicos para la célula beta, especialmente los radicales libre de oxígeno
  - b. Cambio en la expresión de antígenos de membrana de las células beta o inducción de nuevas moléculas que resultan inmunogénicos
  - c. Activación de linfocitos T autoreactivos
  - d. Inducción de la expresión de IFN de tipo I en la célula beta infectada y posterior expresión de citocinas y quimiocinas que reclutan linfocitos citotóxicos hacia el islote
  - e. Inducción de la expresión de IFN-gamma por la célula beta infectada que inducirá una hiperexpresión de moléculas de MHC de clase I y II
  - f. Desequilibrio en el balance Th1/Th2
  - g. Mimetismo molecular: células efectoras que se generan frente a antígenos virales presentan reacciones cruzadas con antígenos propios de las células beta

**Tabla 4.** Tabla resumen de los diferentes virus relacionados con el desarrollo de diabetes en humanos y modelos animales experimentales. Se exponen los posibles mecanismos propuestos para el desarrollo de la enfermedad.

<b>Virus</b>	<b>Tipo</b>	<b>Familia</b>	<b>Hospedador</b>	<b>Posible mecanismo de acción</b>
Rubeola	RNA	Togaviridae	Humano Hamster Conejo	Mimetismo molecular <i>Epitope spreading</i> Alteración de antígenos en la membrana de la célula beta
Enterovirus	RNA	<i>Picornaviridae</i>	Humano Ratón Primates	Destrucción citolítica directa Mimetismo molecular Activación de células T autoreactivas
Retrovirus	RNA	<i>Retroviridae</i>	Humano Ratón	Mimetismo molecular Alteración de antígenos en la membrana de la célula beta Presentación de antígenos virales en la membrana de la célula beta Mecanismo autoinmune desencadenado por la expresión de IFNs
Rotavirus Reovirus	RNA	<i>Reoviridae</i>	Humano Ratón	Mimetismo molecular Efecto sobre síntesis y secreción de insulina Mecanismo autoinmune por desequilibrio Th1/Th2
Paperas	RNA	<i>Paramixoviridae</i>	Humano	Mimetismo molecular Mecanismo autoinmune desencadenado por la expresión de IFNs
Citomegalovirus	DNA	<i>Herpesviridae</i>	Humano	Mimetismo molecular
Encefalomiocarditis	RNA	<i>Picornaviridae</i>	Ratón Hámster	Destrucción citolítica directa Mecanismo autoinmune mediado por citocinas derivadas de macrófagos
Kilham rat virus	DNA	<i>Parvoviridae</i>	Rata	Mecanismo autoinmune mediado por citocinas derivadas de macrófagos Mimetismo molecular (?) Activación de células T autoreactivas
Epstein-Barr	DNA	<i>Herpesviridae</i>	Humanos	Mimetismo molecular
Mengovirus	RNA	<i>Picornaviridae</i>	Ratón	Destrucción citolítica directa
Diarrea viral bovina	RNA	<i>Flaviviridae</i>	Vacuno	Mecanismo autoinmune
Ljungan	RNA	<i>Picornaviridae</i>	Topillo rojo	Destrucción citolítica directa

## 4. Interferones de tipo 1 y diabetes

### 4.1 Generalidades de las citocinas

Las citocinas son proteínas solubles reguladoras de bajo peso molecular (en general de menos de 30kDa) secretadas por todas las células nucleadas, que se unen a receptores específicos en las células diana y alteran su expresión génica regulando reacciones inmunitarias e inflamatorias<sup>230</sup>. Se descubrieron en sobrenadantes de cultivos *in vitro* de linfocitos. Estas moléculas se liberan como respuesta a estímulos discretos y su secreción es de excusa duración, teniendo efectos biológicos a concentraciones picomolares ya que tienen una elevada afinidad por sus receptores. La síntesis de citocinas es transitoria y se regula a nivel transcripcional<sup>231</sup>. La mayoría, tan pronto como se producen se secretan aunque en algunos casos pueden almacenarse a nivel intracitoplasmático. Suelen actuar de manera autocrina o paracrina aunque su acción es pleiotrópica, actúan sobre diferentes tipos celulares. Actúan sobre la síntesis y acción de otras citocinas, de forma que se pueden producir efectos antagónicos o sinérgicos<sup>3</sup>. Las citocinas regulan tanto la respuesta innata como la adaptativa y están implicadas en procesos de crecimiento, diferenciación y reparación celular<sup>231</sup>.

### 4.2 Los interferones: generalidades

Los interferones (IFNs) fueron una de primeras citocinas descritas. Se descubrieron en 1957 por A. Isaacs y J. Lindenmann como factores derivados de las células que inducían una resistencia a ser infectadas por virus e 'interferían' en la replicación del mismo<sup>232</sup>. Comprende una familia de proteínas secretadas, producidas por una gran variedad de células en respuesta principalmente a infecciones de tipo viral pero también a otros estímulos. Se han descrito funciones antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras para estas proteínas. Los IFNs se unen a receptores específicos de membrana.

Los interferones se clasifican en:

#### 1) Interferones ácido-estable o tipo I

Este grupo incluye IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\tau$  (sólo rumiantes), IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$  e IFN- $\omega$  que comparten un receptor común y carecen de intrones<sup>233</sup>. El locus para IFN de tipo I se localiza en el cromosoma 9 en humanos y en el 4 en ratón. El IFN- $\lambda$ , descrito recientemente, comprende 3 proteínas y se parece a los IFN de tipo I en la secuencia y actividad antiviral. Se diferencia del resto de

IFNs de tipo I por la presencia de intrones y la unión a un receptor diferente por lo que se ha catalogado en otra familia de citocinas.

Los genes que codifican para los diferentes IFNs de tipo I presentan un 45% de homología<sup>234</sup>.

## 2) Interferones ácido-lábil o tipo II

Representados por un solo miembro: el IFN-gamma. Es la principal citocina secretada por linfocitos T citotóxicos, linfocitos Th1 y células NK. Sus funciones principales están relacionadas con la inmunidad celular específica: activar macrófagos, aumentar la expresión de moléculas de MHC de clase I y II e incrementar la presentación antigénica<sup>3</sup>. El IFN-gamma es secretado principalmente por linfocitos Th1 y células NK activadas y favorece la inmunidad mediada por células e interfiere en la inducción de la respuesta inmune humoral.

### 4.3 Los interferones de tipo I

Los IFNs de tipo 1 constituyen la primera línea de defensa del organismo frente a infecciones víricas. Tras una infección viral, después de esta primera fase, se secretan otras citocinas como TNF, IL-6, IL-12 e IFN-gamma<sup>235</sup>. Los IFNs de tipo 1 comprenden un grupo de proteínas que se unen a un receptor común: el receptor IFN-alfa/beta que está compuesto por dos subunidades (IFNR1 e IFNR2c)<sup>236</sup>. La secreción de este tipo de IFN se activa principalmente tras una infección vírica, pero estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que otros estímulos pueden activar la producción de estas moléculas: poly (I:C), que mimetiza al RNA viral de doble cadena (ds-RNA); algunas citocinas como IL-10, mitógenos, células tumorales, diferentes microorganismos no virales (protozoos y bacterias) y sus productos<sup>233</sup> y estímulos endógenos como inmunocomplejos y material apoptótico y/o necrótico<sup>237</sup>. Estos estímulos son detectados por uno o más de los 13 TLRs descritos en mamíferos<sup>238</sup>. Las señales mediadas por estos receptores inician la transcripción de cientos de genes entre los que se encuentran los que codifican para citocinas inflamatorias como TNF-alfa y los IFNs de tipo 1, que a su vez modulan la expresión génica<sup>237</sup>.

Una vez los IFNs de tipo 1 se unen al receptor común, la vía clásica de señalización por IFNs de tipo I implica la fosforilación de janus quinasas (Jak1,

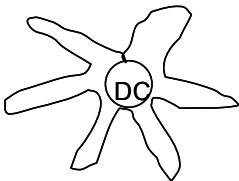

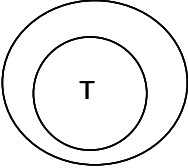
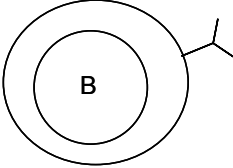
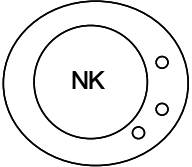
Tyk2) y la consiguiente activación de transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT1, STAT2) que conducen a la transcripción de diversos genes que llevan promotores con elementos de respuesta a estímulo por interferón (*IFN-stimulated response elements*, ISRE). De esta forma se sintetizan diferentes proteínas con actividad antiviral como la proteínquinasa dependiente de RNA de doble cadena (PKR), la sintasa 2',5'-oligoadenilato y la GTPasa Mx, que promueven la degradación de mRNA, inhiben la traducción del mRNA, inducen apoptosis en las células huésped e inhiben la actividad de la polimerasa viral<sup>236</sup>. Los IFNs de tipo 1 pueden inducir la síntesis de más de 300 proteínas entre las que se incluyen enzimas, proteínas de señalización, proteínas de presentación antigénica, factores de transcripción, *heat shock proteins* (*Hsp*) y proteínas apoptóticas<sup>239</sup>. De esta forma se puede inducir resistencia a la replicación vírica en todas las células del organismo.

Los IFNs de tipo 1 promueven la respuesta inmune adaptativa frente a los virus incrementando la expresión de MHC de clase I y la presentación antigénica en la superficie de todas las células<sup>3</sup>. Esto facilitará por un lado la presentación de fragmentos peptídicos virales por parte de las células infectadas a los linfocitos T citotóxicos y por otro, evitará la destrucción de las células no infectadas por parte de las células NK. Además de los efectos antivirales, los IFNs de tipo I ejercen múltiples funciones en células del sistema inmune actuando como inmunoreguladores<sup>233, 237, 240</sup> **(Figura 6)**:

- influyen sobre la generación, maduración y función de las células dendríticas
- mantienen activados a los linfocitos T CD4 y CD8 y promueven su proliferación
- promueven la expansión clonal y longevidad de células T activadas o memoria
- promueven el *cross-priming* de linfocitos T CD8 contra células diana infectadas por virus
- polarizan la respuesta inmune adaptativa hacia repuestas Th1
- potencian las respuestas de las células B2 maduras dependientes de BCR y aumentan su supervivencia inhibiendo su apoptosis
- inducidos con IL-6 promueven la diferenciación de células B activadas a células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas



- potencian la citotoxicidad y la producción de citocinas por parte de las células NK
- actúan sobre el desarrollo, maduración y producción de síntasa inducible por óxido nítrico (*inducible nitric oxide syntase*, iNOS) por macrófagos
- inducen la secreción de citocinas secundarias como IL-15 por parte de las APC

TIPO CELULAR	ACCIONES
	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ o ↓ generación de DC</li> <li>↑ maduración de DC</li> <li>↑ cross-priming de linfocitos T CD8</li> <li>↑ o ↓ producción de IL-12</li> <li>↑ producción de IL-15</li> <li>↑ capacidad estimuladora de las células B</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ o ↓ expresión de iNOS y actividad antimicrobiana</li> <li>↑ o ↓ producción de IL-12</li> <li>↓ expresión de MHC II</li> <li>↑ o ↓ apoptosis</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ generación neonatal de células T mediada por IL-7</li> <li>↑ o ↓ proliferación</li> <li>↑ citotoxicidad de linfocitos citotóxicos</li> <li>Polariza hacia el desarrollo de una respuesta Th1</li> <li>↑ longevidad de células T efectoras y memoria</li> <li>↑ motilidad</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ generación neonatal de células B mediada por IL-7</li> <li>↑ diferenciación en células plasmáticas</li> <li>↑ cambio de isotipo (IgG)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ citotoxicidad</li> <li>↑ producción de IFN-gamma</li> </ul>

**Figura 6.** Principales acciones de los IFN de tipo I sobre diferentes tipos celulares del sistema inmune.

Todas estas respuestas están determinadas por la concentración de IFN y el momento en que este se produce<sup>241</sup>:

- 1) Concentración baja de IFN-alfa/beta tras una infección no viral, una dispersión vírica baja o una infección vírica con baja inducción de IFN

implica: aumento de la citotoxicidad de las células NK, aumento de los efectos de IL-12 y una polarización hacia respuestas Th1

2) Concentración elevada de IFN-alfa/beta debido a una dispersión vírica elevada y/o virus que inducen una elevada expresión de IFN implica: aumento en la citotoxicidad de las células NK, inhibición de los efectos de IL-12, inhibición de la producción de IFN-gamma por las células NK, aumento de las respuestas mediadas por linfocitos CD8 y aumento de la producción de IFN-gamma por parte de estos linfocitos.

Debido a los diversos efectos que los IFNs de tipo I ejercen en la inmunidad innata y adaptativa, estas citocinas pueden tener un papel clave en el desarrollo de autoinmunidad como evidencian diversos estudios realizados en lupus y DT1<sup>237</sup>.

## **5. Modelos animales**

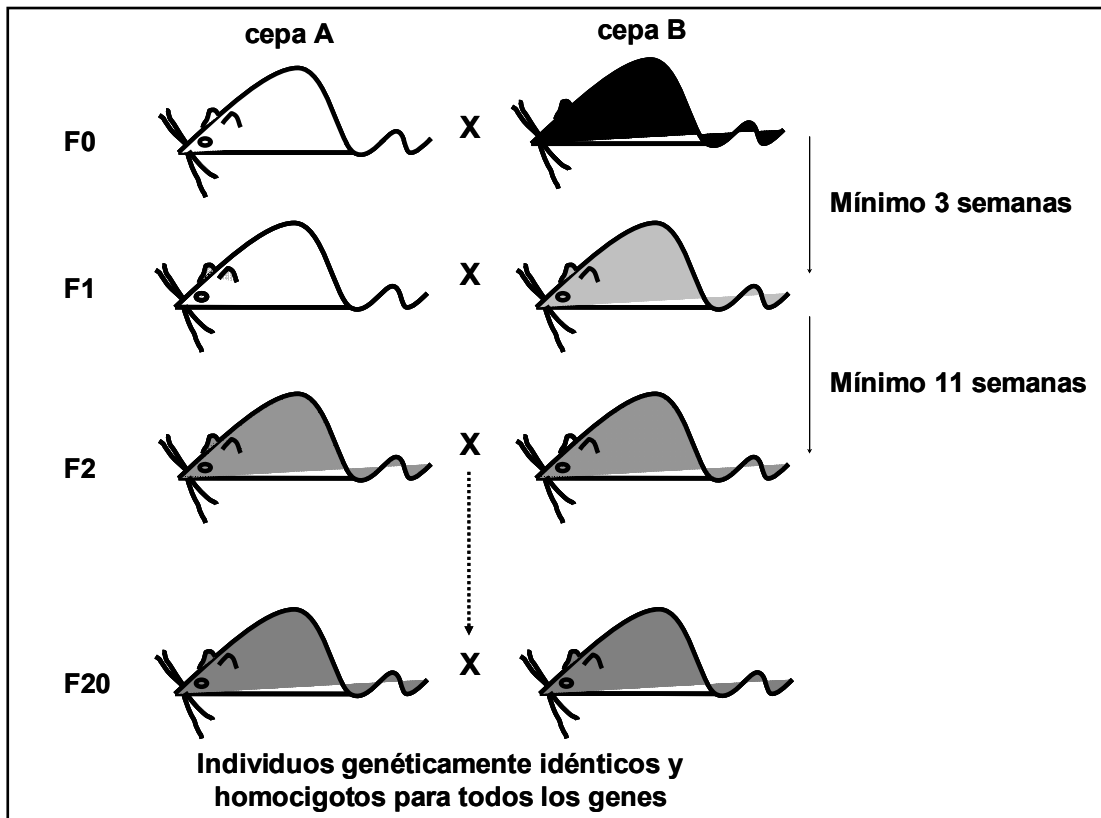
El uso de modelos animales en el estudio de la DT1 es necesario dada la dificultad de estudiar la patogénesis de esta enfermedad en humanos: 1) el órgano diana es bastante inaccesible (retroperitoneal), 2) su manipulación muchas veces comporta efectos colaterales que pueden ser graves, 3) los procesos que preceden al inicio clínico de la enfermedad son asintomáticos y pueden durar de meses a años, 4) los procesos patológicos que tienen lugar a nivel local insular, no se reflejan a nivel periférico y 5) por todo esto en conjunto, es difícil determinar qué individuos en la población general desarrollarán DT1. Para superar estas dificultades, el estudio de la enfermedad en modelos experimentales animales, principalmente rata y ratón, ha sido una estrategia válida.

### **5.1 Conceptos básicos**

#### **5.1.1 Cepas consanguíneas, endogámicas o inbred**

Las cepas consanguíneas son el resultado del cruzamiento entre hermanos durante como mínimo veinte generaciones (que se numeran F1, F2, F3....)<sup>242</sup>. Todos los individuos son genéticamente idénticos entre sí y homocigotos (>98%) para todos los genes, lo que nos permite asegurar que la variabilidad de los parámetros experimentales se debe factores no genéticos

clásicos (**Figura 7**). Los cruzamientos para la primera línea consanguínea de ratón empezaron en 1909 por C.C. Little (que años más tarde fundaría The Jackson Laboratory) en la Universidad de Harvard y dió como resultado la cepa DBA<sup>243</sup>. La creación de las cepas consanguíneas ha permitido avanzar en los estudios sobre transplante ya que no presentan rechazo al injerto.



**Figura 7.** Generación de una cepa consanguínea.

### 5.1.2 Cepas no consanguíneas u outbred

Las cepas no consanguíneas son colonias de animales que genéticamente son diferentes entre ellos. Muestran vigor híbrido: resistencia a enfermedades, camadas más grandes que las cepas consanguíneas, poca mortalidad neonatal y rápido crecimiento. Estas características han hecho que sean los progenitores de elección durante los procesos de transgénesis y *knock-out*. Se usan en estudios donde la implicación genética no es determinante.

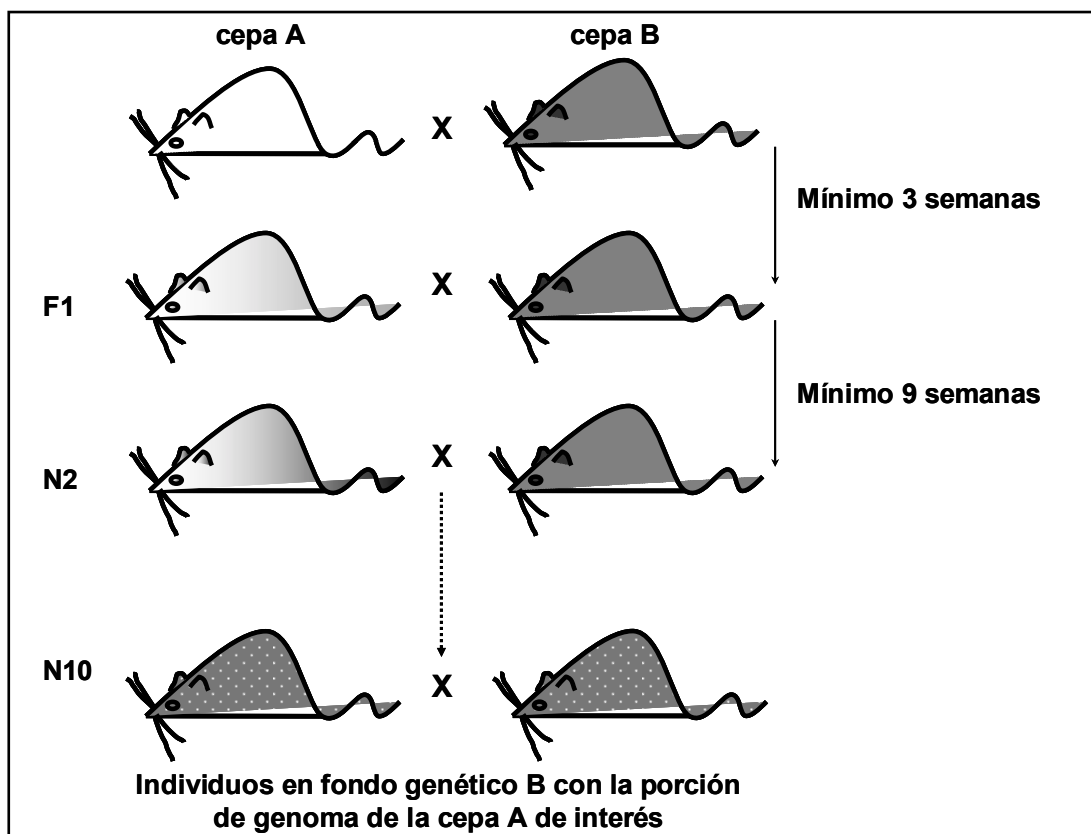
### 5.1.3 Híbridos F1

Es el resultado del cruzamiento de dos cepas consanguíneas. Los individuos resultantes son todos idénticos entre sí (isogénicos) pero

heterocigotos para todo el genoma<sup>242</sup>. Las características principales de estos animales son la uniformidad genética y el vigor híbrido, que los hará físicamente superiores a las líneas parentales. El resultado del cruzamiento de dos híbridos F1 dará una descendencia donde todos los animales (F2) son genotípicamente diferentes.

#### 5.1.4 Cepas congénicas

Una cepa congénica es una cepa consanguínea a la que se ha introducido parte del genoma de otra cepa<sup>244</sup>. Esto se consigue mediante retrocruzamientos selectivos entre la cepa donante y receptora. Hay que tener en cuenta que la cepa receptora no recibe sólo el locus seleccionado sino que incorpora parte del cromosoma de la cepa donante. Para eliminar al máximo el genoma de la cepa donante se recomienda hacer como mínimo diez retrocruzamientos. Este número puede reducirse si en cada cruzamiento se seleccionan como progenitores los animales de cada camada que han incorporado más genoma de la cepa receptora: a este sistema se denomina *speed congenics*. Para determinar la adquisición del material genético de interés, se utilizan marcadores microsatélites que en función del tamaño permiten diferenciar las diferentes cepas (**Figura 8**).



**Figura 8.** Generación de una cepa congénica

## **5.2 Modelos animales de diabetes tipo 1**

Para el estudio de los diferentes aspectos de la enfermedad mediante el uso de modelos animales, existen diferentes estrategias: la inducción de la enfermedad mediante técnicas quirúrgicas o farmacológicas, el uso de modelos espontáneos de DT1 o la generación de modelos manipulados genéticamente.

### **5.2.1 Modelos inducidos farmacológicamente**

La inducción farmacológica de la enfermedad consiste en la administración de dosis ajustadas de fármacos con propiedades diabetogénicas.

#### **5.2.1.1 Estreptozotocina (STZ)**

La STZ [2-deoxi-2(3-metil-3 nitrosoureido)-D-glucopiranososa] es un antibiótico de amplio espectro sintetizado por *Streptomyces achromogenes* con propiedades diabetogénicas, utilizado para el tratamiento de algunos tumores en humanos. La STZ entra en la célula beta a través de transportador de glucosa GLUT2 y provoca daño principalmente por fragmentación y alquilación del DNA<sup>245</sup>. Este método de inducción de DT1 fue descrito en rata y ratón en 1976 y existen dos variantes<sup>246</sup>:

1) La administración de una sola dosis diabetogénica induce necrosis de la célula beta tan sólo unas horas después y se observa una hiperglicemia marcada en 24-48 horas.

2) La administración de múltiples dosis subdiabetogénicas produce un retraso de la hiperglicemia hasta 5-6 días<sup>247</sup>. Histológicamente los islotes presentan insulitis (formada por linfocitos y macrófagos) e hiperexpresión de MHC de clase I en el tejido endocrino a la semana post-administración. Después de dos semanas, la insulitis remite y los islotes muestran alteración de la estructura insular y necrosis.

#### **5.2.1.2 Aloxano**

El aloxano (2,4,5,6-tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracil), fármaco antineoplásico derivado de la pirimidina, es otro tóxico específico de células beta descrito por Brugnatelli en 1818<sup>248</sup>. Las propiedades diabetogénicas de

este fármaco fueron publicadas en 1943 por J.S. Dunn y colaboradores que estudiaron el efecto de su administración sobre conejos y describieron una necrosis específica de los islotes pancreáticos. El aloxano y el producto de su reducción, el ácido dialúrico, establecen un ciclo redox con la formación de radicales superóxido<sup>249</sup> lo que conduce a una fragmentación del DNA en la célula beta. La administración de una sola dosis produce una marcada hiperglicemia a los cinco días, necrosis de los islotes y ausencia de infiltrado. El rango de dosis diabetogénica es muy estrecho y si se sobrepasa se produce la muerte del animal por necrosis de las células tubulares de riñón.

### **5.2.1.3 Ciclofosfamida (Cy)**

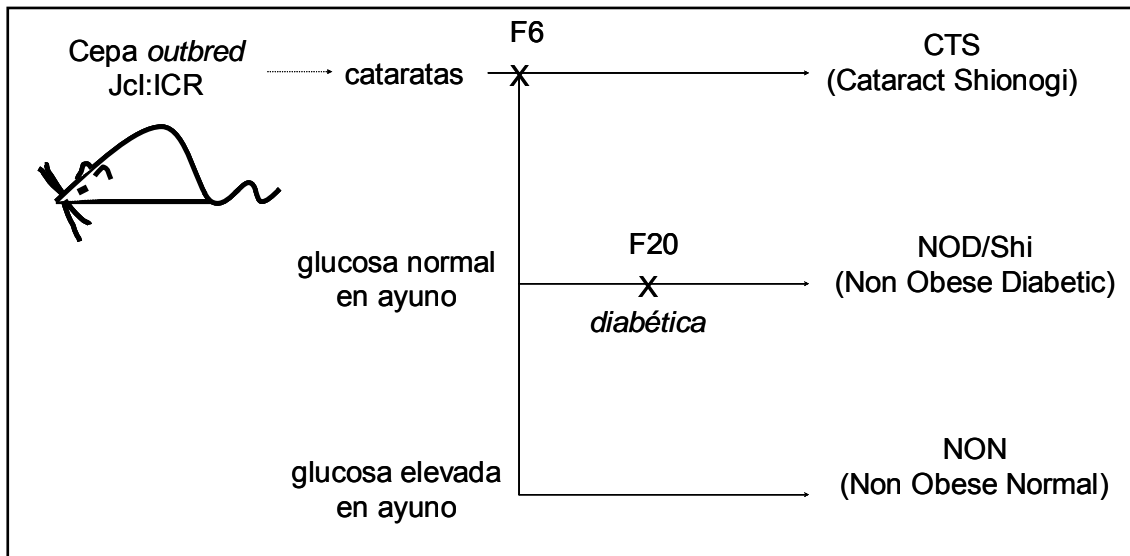
La ciclofosfamida pertenece a un grupo de fármacos usados en quimioterapia denominados agentes alquilantes. La administración de este fármaco promueve el desarrollo de diabetes autoinmune en ratones de la cepa NOD de ambos sexos<sup>250</sup>. Dosis elevadas de forma intraperitoneal inducen una incidencia variable de la enfermedad pero con un 100% de insulinitis en todos los animales a los 30 días de la primera inyección. Se ha propuesto que la Cy actúa sobre células reguladoras/supresoras<sup>251</sup>. El mecanismo patogénico de este modelo es autoinmune: macrófagos y células T tienen relevancia en el desarrollo de la enfermedad ya que el tratamiento con silica y anticuerpos anti-Lyt2 la previene<sup>252</sup>.

### **5.2.2 Modelos espontáneos**

Durante la generación de cepas consanguíneas de rata y ratón, algún individuo ha desarrollado espontáneamente DT1. Estas líneas se seleccionaron de forma que se han originado cepas en las que un porcentaje considerable de los individuos desarrolla de forma natural la enfermedad.

#### **5.2.2.1 El ratón *nonobese diabetic* (NOD)**

Es el modelo espontáneo de DT1 más estudiado en la actualidad. Surgió hace más de 25 años en el Shionogi Research Laboratories en Aburahi, Japón en las investigaciones del Dr. S. Makino durante la selección de una cepa susceptible a desarrollar cataratas a partir de la colonia Jcl:ICR<sup>253</sup>. En 1974 una hembra en F20, espontáneamente desarrollo diabetes, a partir de cría selectiva de esta línea se creó la cepa NOD/Shi (**Figura 9**).



**Figura 9.** Origen del modelo murino de diabetes espontánea NOD

La incidencia de la enfermedad es de 60-80% en hembras y 20-30% en machos<sup>254</sup> a las 30 semanas de edad, en función de las condiciones de estabulación. Aunque los síntomas clínicos de la enfermedad aparecen a partir de las 12 semanas de edad (con un pico entre las 16-18), la infiltración de los islotes o insulitis empieza a partir de las 3 semanas de edad. La insulitis está formada por células T, B, NKs, macrófagos y células dendríticas, pero se ha descrito que el desarrollo de la enfermedad depende principalmente de células T CD4 y CD8<sup>255,256</sup>. Recientemente se ha implicado transcritos específicos de células NK y proporciones elevadas de estas células en el infiltrado en el desarrollo de insulitis destructiva<sup>129</sup>.

El modelo murino NOD es además susceptible a desarrollar otros síndromes autoinmunes: sialitis<sup>257</sup>, tiroiditis<sup>258</sup>, polineuropatía periférica<sup>259</sup>, prostatitis y un síndrome similar al lupus eritematoso sistémico<sup>260</sup>.

Varios genes están implicados en la susceptibilidad a desarrollar diabetes en el modelo NOD. Esta cepa tiene un único haplotipo del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) denominado H-2<sup>97</sup> que es el que aporta la mayor susceptibilidad genética a la enfermedad<sup>69,261</sup>. Esta susceptibilidad reside en la falta de expresión de I-E (homólogo de DR en humanos) y en la expresión de un único locus I-A $\beta$  que contiene una serina en posición 57 y es similar al locus 'diabetogénico' humano HLA-DQ $\beta$ <sup>262</sup>

Otros loci que contribuyen al desarrollo de la enfermedad se denominan *Idd* (homólogos a los IDD humanos) y hasta el momento se han identificado aproximadamente 20 *Idd* potenciales<sup>69</sup>. De algunos de estos locus se han propuesto genes candidatos: para *idd1* se han propuesto MHC de clase I y II, para *idd13* el gen de la beta-2-microglobulina y para *idd16* el gen que codifica para H-2<sup>k73</sup>. La contribución de cada uno de estos *loci* al desarrollo de la enfermedad se estudia mediante la generación de animales congénicos. Se desconoce aún qué elementos estructurales o reguladores codifican la mayoría de estos loci, pero el desarrollo de la enfermedad podría estar también influenciado por la falta de genes protectores. Por ejemplo, aunque se desconoce qué codifica, la homocigosis en *Idd4* influencia la frecuencia y severidad de la insulinitis y la progresión a diabetes<sup>63</sup>.

El sistema inmune del NOD presenta numerosas alteraciones: defectos en la maduración y función de macrófagos<sup>263</sup>, elevado porcentaje de linfocitos T en órganos linfoides periféricos<sup>264</sup>, bajos niveles en la actividad de las células NK<sup>265,266,267</sup>, defectos en el número y función de las células NKT<sup>268</sup>, deficiencias en la población T reguladora CD4+CD25+<sup>269</sup>, defectos en la apoptosis de timocitos<sup>270</sup> y deficiencias en el sistema del complemento<sup>271</sup>.

El ratón NOD muestra defectos en la tolerancia central a consecuencia de alteraciones en los procesos de selección tímica. El estudio de la estructura cristalina de la molécula H-2<sup>g7</sup> en el ratón NOD, sugiere que esta molécula podría ser intrínsecamente inestable. Como consecuencia de esta inestabilidad, la molécula se une de forma muy débil los péptidos dando lugar a una pobre selección negativa en respuesta a los péptidos propios en el timo<sup>272,273</sup>. En otros estudios se ha demostrado que los timocitos maduros del NOD tienen una sensibilidad alterada a la selección negativa<sup>274</sup>, de forma independiente a la expresión de H-2<sup>g7</sup> y en la que actúan procesos de apoptosis dependientes e independientes de Fas. En un modelo de doble transgénico para TCR y antígenos propios, se ha demostrado que el modelo NOD presenta una disminución en la capacidad de eliminar TCRs específicos para antígenos propios cuando se compara con otro fondo genético<sup>275</sup>. Estudios sobre la expresión de ciertos autoantígenos en el timo<sup>276,277</sup> y la descripción de un defecto en la expresión de AIRE en el modelo NOD<sup>278</sup>, sugieren que las anomalías a nivel de tolerancia central en este ratón podrían estar implicadas en el desarrollo de la autoinmunidad.



Los mecanismos de tolerancia periférica que también podrían estar implicados en el desarrollo de diabetes en el modelo NOD se han estudiado mediante bloqueo de moléculas implicadas en estos mecanismos y a la tecnología de los organismos modificados genéticamente. Se han hecho numerosos estudios sobre las moléculas de coestimulación y su papel en el desarrollo de diabetes. El bloqueo mediante anticuerpos de la vía CD28/B7<sup>279</sup> y la caracterización del doble knock-out CD28 y B7-1/B7-2<sup>280</sup> demuestran que el bloqueo de esa vía acelera la aparición de insulinitis y diabetes en el modelo NOD. La coestimulación a través de CD28 se ha demostrado que tiene efecto sobre la polarización Th1/Th2 y el *knock-out* para esta molécula desarrolla preferencialmente una respuesta Th1 así como un defecto en el número y función de células T reguladoras CD4+CD25+. El bloqueo mediante anticuerpos de ICOS, molécula de la familia de CD28<sup>281</sup>, acelera la diabetes y disminuye el número de células T reguladoras en el modelo transgénico BDC2.5<sup>282</sup>. El bloqueo de las interacciones CD40/CD154 parecen ser importantes en los primeros estadios de la enfermedad<sup>283</sup> aunque el modelo *knock-out* de CD154 no desarrolla insulinitis ni diabetes<sup>284</sup>.

Por otro lado, las células presentadoras de antígeno del modelo NOD producen un perfil de citocinas que promueven respuestas Th1 si se compara con otras cepas de ratón<sup>285,286</sup> aunque otros estudios apuntan a que esta polarización se debe a la población T CD4+ y no a las APC<sup>287</sup>.

El modelo NOD presenta un menor número de células NKT tanto en el timo como en la periferia<sup>288,289</sup>. Estas células pueden potencialmente polarizar la población T hacia Th2<sup>290</sup> y la transferencia de elevadas NKT<sup>291</sup> así como el tratamiento con alfa-galactosilceramida ( $\alpha$ -GalCer)<sup>292</sup>, que es una sustancia que activa NKTs, previene el desarrollo de diabetes en el modelo NOD.

El desarrollo de insulinitis y posterior progresión a diabetes parece estar relacionado con la expresión de ciertas quimiocinas y citocinas a nivel de páncreas. Algunas de estas moléculas promueven el tráfico linfocitario hacia los islotes<sup>293</sup> y otras están involucradas en la formación de folículos linfoides terciarios en el páncreas<sup>294</sup>.

En las investigaciones con el modelo NOD es indispensable que los animales se mantengan en condiciones libres de patógenos. Diferentes estudios apuntan a que la presencia de patógenos tanto en humanos como en modelos animales, reduce la incidencia de la enfermedad<sup>97</sup>. Infecciones con

algunos parásitos y bacterias pueden prevenir el desarrollo de la enfermedad mediante diferentes mecanismos que se detallan en la **Tabla 6**. Los virus pueden ser la causa pero paradójicamente también pueden prevenir la aparición de diabetes: el modelo NOD disminuye drásticamente la incidencia de la enfermedad cuando se infecta con el Virus de la Hepatitis Murina<sup>93</sup>. Otros virus que se han asociado a la prevención de la enfermedad en el modelo NOD son: virus de la coriomeningitis linfocítica murina, virus cocksakie B y virus de la encefalomiocarditis<sup>229</sup>. Los mecanismos propuestos para la prevención del desarrollo de DT1 en este modelo espontáneo de DT1 después de una infección se resumen en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Patógenos relacionados con la prevención del desarrollo de DT1 en modelos murinos.

Patógeno	Tipo	Posible mecanismo
<i>Salmonella typhimurium</i>	Bacteria	Reducción de DC en periferia de forma que influencia la presentación antigénica
<i>Mycobacterium avium</i>	Bacteria	Inducción de células T reguladoras
<i>Mycobacterium bovis</i>	Bacteria	Inducción de macrófagos inhibidores y células T reguladoras
<i>Schistosoma mansoni</i>	Helminto	Inducción de una respuesta Th2
Hepatitis Murina	Virus	Inducción de una respuesta Th2
Coriomeningitis linfocítica murina	Virus	Depleción de la subpoblación CD4
<i>Cocksakie B</i>	Virus	Inducción de una respuesta inmunoreguladora
Encefalomiocarditis	Virus	Inducción de una respuesta inmunoreguladora

### 5.2.2.2 La rata Bio-Breeding (BB)

La rata BB es primer modelo animal de diabetes espontánea que se describió en 1975. Deriva, mediante cría selectiva, de una colonia de ratas Wistar de los laboratorios Bio-Breeding en Ottawa, Canadá<sup>295</sup>. La diabetes clínica se desarrolla en el 90% de la población en condiciones SPF, sin diferencias entre sexos y con un periodo prediabético de 2-4 semanas antes del inicio clínico de la enfermedad a partir de las 8 semanas de vida<sup>296</sup>. El inicio clínico de la enfermedad se caracteriza por pérdida de peso, poliuria, polidipsia, hiperglicemia, glucosuria, hipoinsulinemia y al contrario que el modelo NOD, desarrollan cetoacidosis y mueren en el plazo de una semana en ausencia de insulina exógena<sup>297</sup>. Existe una susceptibilidad genética ligada a la enfermedad y los genes más implicados son los del MHC: polimorfismos en el

haplotipo RT1<sup>u</sup> que corresponden al *iddm2*<sup>298</sup>. Para el desarrollo de la enfermedad en este modelo animal, es imprescindible que se dé una mutación en el gen *lyp* (lymphopenia), localizado en el cromosoma 4 y designado como *iddm1*<sup>299,300</sup>. Cuando se presenta en homocigosis es responsable de la linfopenia - principalmente de linfocitos T CD8- característica de la rata BB<sup>301</sup>.

Se han descrito otras anomalías a nivel del sistema inmune en este modelo animal:

- defectos en las APCs, principalmente en el número y expresión de moléculas en las células dendríticas<sup>302, 303</sup>
- disminución en el número de células NK<sup>304</sup>
- alteraciones en el timo que se han asociado a defectos a nivel de tolerancia central<sup>305, 306</sup>

### **5.2.2.3 La rata Long-Evans Tokushima Lean (LETL)**

Este modelo espontáneo de diabetes se describió en 1991 como resultado de cruzamientos endogámicos de un animal diabético que apareció en el Tokushima Research Institute<sup>307</sup>. Como en el modelo NOD se observa infiltración pancreática y de las glándulas salivares y lacrimales. La selección de la subcepa Komeda, predispuesta a la enfermedad, aumentó la incidencia hasta un 70% con insulinitis en el 100% de los animales a los 120 días de edad<sup>308</sup>. Gran parte de la susceptibilidad a la enfermedad la aporta el haplotipo RT1<sup>v</sup> del MHC, compartido con la rata BB<sup>309</sup>. Este modelo ilustra muy bien la DT1 que se produce en humanos por que tiene similar forma de aparición, no existe predisposición por sexos, carece de la linfopenia presente en otros modelos animales y existe una fuerte asociación con el MHC de clase II<sup>73</sup>.

### **5.2.3 Modelos modificados genéticamente**

Las técnicas de manipulación genética han permitido estudiar cuál es el papel de ciertas moléculas en el desarrollo de la enfermedad analizando su expresión o bloqueo a nivel local o sistémico. En el estudio de la DT1 se han utilizado tanto modelos transgénicos como *knock-out* para determinar el papel de ciertas moléculas y los mecanismos en los que estas están implicadas. Los principales modelos transgénicos y *knock-out* en el estudio de DT1 se han diseñado para moléculas de MHC, citocinas, autoantígenos y moléculas

coestimuladoras<sup>310</sup>. Son de gran importancia los modelos transgénicos de TCRs que reconocen autoantígenos implicados en la enfermedad.

### **5.2.3.1 Modelos transgénicos**

Los animales transgénicos contienen DNA exógeno adicional en cada célula de su organismo de forma que se transmite de hereditariamente. La inserción del nuevo gen, normalmente produce la expresión de una nueva proteína en células específicas que vendrá determinada por el promotor. Se puede producir también una pérdida de función de genes existentes si la integración del DNA interrumpe algún gen. La técnica más utilizada para la generación de animales transgénicos es la microinyección de DNA en el pronúcleo masculino. El DNA se insertará de forma aleatoria de forma que algunos individuos lo habrán incorporado en la línea germinal.

#### **5.2.3.1.1 Modelos transgénicos de TCR**

Se han aislado clones de célula T de animales pre-diabéticos y diabéticos cuyos TCRs se han utilizado para la producción de TCRs transgénicos en ratones de varios fondos genéticos. Todos los linfocitos T de estos animales presentan todos el mismo TCR. Una de las limitaciones del uso de estos modelos, es el desconocimiento del antígeno que reconocen los TCRs. El modelo transgénico BDC2.5, cuyo TCR fue generado a partir de un clon de células T específico de un autoantígeno de islote no identificado, desarrolla una insulinitis severa a partir de las tres semanas que va seguida de una incidencia de diabetes clínica inferior a la del modelo NOD. El transgén en NOD-SCID, acelera el desarrollo de diabetes con una incidencia del 100%, lo que sugiere que en el NOD normal podría existir algún tipo de mecanismo regulador que impidiese el desarrollo de la enfermedad.

El modelo transgénico 8.3, presenta una aceleración de la enfermedad con un corto periodo de insulinitis benigna. El antígeno diana del TCR es la molécula IGRP (*islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein*)<sup>311</sup>. La expresión del transgén en un modelo *knock-out* para RAG2, inmunodeficiente, implica una disminución en la incidencia de la enfermedad demostrando el importante papel de las células CD4 en reclutar a los linfocitos CD8 hasta los islotes.

**Tabla 7.** Modelos transgénicos que expresan TCRs de clones de células T diabetogénicos

TRANSGÉN	INSULITIS	DIABETES	REF.
BDC2.5 (CD4)	↑	↓	312
8.3 (CD8)	↑	↑	313

### 5.2.3.1.2 Modelos transgénicos de moléculas de MHC

Una de las características genéticas del modelo NOD es la carencia de la molécula I-E y se ha demostrado que la expresión transgénica de I-E en este ratón puede prevenir la enfermedad. Cuando sólo se expresa transgénicamente una de las cadenas de la molécula I-A<sup>k</sup>, la enfermedad no se previene, lo que indica que la sustitución de una serina por un ácido aspártico en la posición 57 de la cadena I-A beta no es suficiente para prevenir la enfermedad. Al expresar transgénicamente las dos cadenas de la molécula I-A<sup>g7</sup>, fuertemente ligada a la enfermedad, por la molécula I-A<sup>k</sup> la incidencia de DT1 disminuye.

**Tabla 8.** Modelos transgénicos de moléculas de MHC

TRANSGÉN	INSULITIS	DIABETES	REF.
E $\alpha^d$	↓	↓	314
A $\alpha^k$	=	=	315
A $\beta^k$	=	=	315
A $\alpha^k$ A $\beta^k$ (I-A <sup>k</sup> )	↓	↓	316

### 5.2.3.1.3 Modelos transgénicos de citocinas

El primer gen de citocinas en insertarse en el genoma murino bajo el control del promotor de la insulina fue el IFN-gamma<sup>326</sup>. La expresión transgénica de citocinas, confiere un papel patogénico a IL-2, IL-10 y los IFNs tanto de tipo I como II, mientras que IL-4, IL-6 y TGF-beta tendrían un papel protector<sup>317</sup>. Algunas citocinas como TNF-alfa tienen efectos variables en función de la edad a la que se expresa: en animales neonatales promueve una aceleración de la enfermedad potenciando la presentación de autoantígenos a células T autoreactivas, mientras que la expresión en adultos se asocia a una disminución de las células CD8 citotóxicas y sus funciones en los islotes.

**Tabla 9.** Modelos transgénicos de citocinas

TRANSGÉN	INSULITIS	DIABETES	REF.
IL-2	↑	↑	318
IL-4	↓	↓	319
IL-6	↑	↓	320, 321
IL-10	↑	↑	322
TNF-alfa	↑ o ↓	↑ o ↓	323,324
TGF-beta	↓	↓	325
IFN-gamma	↑	↑	326,327
IFN-alfa	↑	↑	328
IFN-beta	↑	↑	329,330
IFN-kappa	↑	↑	331

**5.2.3.1.4 Modelos transgénicos de autoantígenos**

La expresión transgénica de proinsulina bajo el promotor de MHC de clase II previene la aparición de diabetes por la expresión de este autoantígeno en el timo, de forma que permite una correcta selección negativa de los linfocitos T específicos para insulina. Esto no ocurre en el caso del GAD, donde la expresión transgénica de GAD65 bajo el promotor de MHC de clase I, no sólo no induce tolerancia sino que aumenta la autoinmunidad frente a los islotes de forma directamente proporcional a la expresión cuantitativa de GAD65, que en condiciones fisiológicas es muy baja<sup>332</sup>. La expresión de Hsp60 bajo el promotor de clase II en el modelo NOD induce tolerancia frente a los islotes debido a que se expresa en APCs de timo, de forma que se induce tolerancia inmunológica por delección clonal.

**Tabla 10.** Modelos transgénicos de autoantígenos

TRANSGÉN	INSULITIS	DIABETES	REF.
Proinsulina	↓	NO	333
GAD	↑	↑	334
Hsp60	↓	↓	335

### 5.2.3.1.5 Modelos transgénicos de moléculas coestimuladoras

El modelo transgénico que expresa CTLA-4 (CD154) de forma soluble, se une con alta afinidad a las moléculas CD80/CD86 bloqueando la estimulación y provocando una aceleración de la diabetes. La expresión de CD80 en los islotes pancreáticos también acelera la diabetes en el modelo NOD, aunque no produce enfermedad en el fondo genético resistente C57BL/6J, ya que la expresión de esta molécula co-estimuladora por parte de las células beta las convierte en eficientes presentadoras de antígeno y pueden potenciar los procesos autoinmunes.

**Tabla 11.** Modelos transgénicos de moléculas coestimuladoras

TRANSGÉN	INSULITIS	DIABETES	REF.
CD152 (CTLA-4)	↑	↑	280
CD80	↑	↑	336

### 5.2.3.1.6 Modelos transgénicos de péptidos virales

La tecnología de los transgénicos ha permitido establecer modelos animales que expresan antígenos microbianos en órganos diana de autoinmunidad. En el estudio de la DT1 el modelo más ampliamente utilizado es el ratón que expresa un glicoproteína (GP) del virus de la coriomeningitis linfocítica (*lymphocytic choriomeningitis virus*, LCMV) bajo el promotor de la insulina de rata: el ratón RIP-GP<sup>337,338</sup>. En este modelo, un antígeno viral se expresa exclusivamente en las células beta pancreáticas. En ausencia de una activación apropiada, los clones de células T específicos para este antígeno, que no son delecionados ni en timo ni en periferia, ignoran al antígeno de forma que no se desarrolla diabetes autoinmune. Una sola inmunización con DC que presentan péptidos de la glicoproteína del LCMV, implica una activación de las células T de forma que se produce insulitis pero no diabetes. Si esta inmunización se repite, sí implica el desarrollo de diabetes clínica.

Cuando el ratón RIP-GP se cruza con un modelo transgénico con un TCR específico para LCMV, tampoco desarrolla diabetes espontánea aunque cuando se induce mediante inmunización, aparece de forma acelerada<sup>337</sup>.

De este modelo original se han desarrollado diferentes variantes con otros ratones transgénicos convencionales, transgénicos inducibles y *knock-out* para estudiar el papel de diferentes moléculas en este sistema<sup>73,339,340</sup>.

Existe otro modelo transgénico de péptidos virales que expresa en islotes y timo la nucleoproteína (NP) del LCMV, el ratón RIP-NP. Cuando se inmunizan desarrollan una diabetes de curso muy lento (de tres a seis meses) debido a una baja afinidad de los linfocitos T autoreactivos<sup>341</sup>.

**Tabla 12.** Modelos transgénicos de péptidos virales

TRANSGÉN	INSULITIS	DIABETES	REF.
RIP-GP	NO	NO o acelerada si TCR + inmunización	337,338
RIP-NP	NO	NO o retrasada si inmunización	341

### 5.2.3.1 Modelos knock-out

Los animales *knock-out* contienen la misma mutación, introducida de forma artificial, en todas las células del organismo de forma que se impide la expresión del gen seleccionado. La técnica más utilizada para la producción de animales *knock-out* es la transferencia génica mediada por células progenitoras embrionarias o *gene targeting*. El DNA con la mutación se introduce en células progenitoras embrionarias que se diferenciarán en todos los tipos celulares cuando se introducen en un embrión en la fase de blastocisto. La inserción del DNA con la mutación tiene lugar por recombinación homóloga y es muy importante que afecte a la línea germinal.

#### 5.2.3.1.1 Modelos knock-out de moléculas de MHC

Los animales deficientes en moléculas de MHC no desarrollan la enfermedad. Los ratones deficientes en beta-2-microglobulina carecen tanto de MHC de clase I como de linfocitos T CD8, lo que demuestra un papel esencial de estos componentes en el desarrollo de DT1. Los animales NOD que no expresan MHC de clase II carecen también de células CD4 periféricas y aunque los islotes muestran una infiltración evidente, estos ratones no desarrollan diabetes clínica.

**Tabla 13.** Modelos *knock-out* de moléculas de MHC

MUTACIÓN	INSULITIS	DIABETES	REF.
Beta-2-microglobulina	NO	NO	342
CIITA	↓	NO	343



### 5.2.3.1.2 Modelos *knock-out* de citocinas

La deficiencia de citocinas de Th2 no influye en el desarrollo de la enfermedad, de forma que parece que no ejercen ningún papel en la severidad de la insulinitis. La falta de IFN-gamma, retrasa pero no previene el desarrollo de la enfermedad. La ausencia de IL-12 implica una insulinitis y una incidencia de la enfermedad similar al modelo NOD, con un componente principal Th1.

**Tabla 14.** Modelos *knock-out* de citocinas.

MUTACIÓN	INSULITIS	DIABETES	REF.
IL-4	=	=	344
IL-10	=	=	345
IFN-gamma	=	= (retrasa inicio clínico)	346
IL-12	=	= (retrasa inicio clínico)	347

### 5.2.3.1.3 Modelos *knock-out* de autoantígenos

La deficiencia de GAD, disminuye la insulinitis y la incidencia de la enfermedad en el modelo NOD *knock-out* con la mutación específica para GAD65 y GAD67 en las células beta pancreáticas pero no se observan diferencias respecto a la cepa original cuando la mutación es de GAD65 de forma sistémica. El *knock-out* para insulina 1 presenta una reducción notable de insulinitis e incidencia de diabetes mientras que el de insulina 2 muestra una incidencia de la enfermedad superior al modelo original NOD. Esto podría ser debido a que la insulina 2 pero no la 1 se expresa en el timo, de forma que podría inducir tolerancia central. Estos datos apuntan a que la insulina 1 es un autoantígeno importante en el modelo NOD. Los ratones *knock-out* para ambos tipos de insulina mueren a los pocos días de nacer. La carencia del autoantígeno IA-2 en ratón implica una alteración en la tolerancia a la glucosa y la secreción de insulina, pero no desarrollo de diabetes en el modelo NOD.

Recientemente, el grupo dirigido por el Dr G.S. Eisenbarth ha descrito la generación de un doble *knock-out* para la insulina que expresa transgénicamente la insulina 1 con una mutación en el fragmento más inmunogénico<sup>348</sup>, cambio en el residuo 16 de la cadena beta de la proinsulina de una tirosina a una alanina. Esta mutación evita la activación de clones de

células T autoreactivos y los animales no desarrollan autoanticuerpos, ni insulinitis ni diabetes.

**Tabla 15.** Modelos *knock-out* de autoantígenos

MUTACIÓN	INSULITIS	DIABETES	REF.
GAD	↓ o =	↓ o =	349,350
Insulina 1	↓	↓	351
Insulina 2	↑	↑	352
IA-2	=	=	353

#### 5.2.3.1.4 Modelos *knock-out* de moléculas coestimuladoras

Los animales deficientes en estas moléculas coestimuladoras, presentan un agravamiento de la enfermedad a causa de una disminución en el número de células T reguladoras CD4+CD25+, muy importantes para el control del desarrollo de DT1. Por otro lado, la producción de IFN-gamma y TNF-alfa por parte de las células T antígeno específicas está potenciada en estos animales *knock-out*. La diferenciación de las células *naive* diabetogénicas a Th2, depende de la señalización por CD28 con lo cual la carencia de esta molécula implica una polarización hacia Th1.

**Tabla 16.** Modelos *knock-out* de moléculas coestimuladoras

MUTACIÓN	INSULITIS	DIABETES	REF.
CD80/CD86	↑	↑	354
CD28	↑	↑	280

### 5.3 Modelos usados como controles en el estudio de la DT1

En los estudios de modelos animales de susceptibilidad a DT1, se estudian en paralelo animales control que por sus características genéticas o por su fenotipo inmunodeficiente, son resistentes a la enfermedad.

#### 5.3.1 El ratón *nonobese resistant* (NOR)

El modelo NOR/Lt fue descrito en 1992 por M. Prochazka del The Jackson Laboratory<sup>355</sup>. Este modelo es resistente a la insulinitis y a la diabetes. Surgió como una contaminación genética del modelo NOD/Lt con la cepa

resistente C57BL/KsJ. Los marcadores genéticos de la mayoría de cromosomas, incluyendo el complejo H-2<sup>97</sup> en el cromosoma 17, pertenecen a la cepa NOD/Lt. Hay al menos 5 cromosomas<sup>356</sup>: 2, 4, 7, 11 y 12 que contienen genes que derivan de la cepa C57BL/KsJ, esto indicaría que los genes de resistencia a la enfermedad son independientes de H-2.

El estudio de los páncreas de estos animales ha demostrado que son resistentes a la insulinitis (sólo 2 de cada 40 islotes analizados presenta infiltrado) y por tanto no desarrollan diabetes. En cambio, sí que son sensibles a la infiltración de las glándulas salivares, presentando la mayoría de los animales sialitis. La caracterización de las subpoblaciones esplénicas de estos animales, muestra unos porcentajes de células T y B más parecido al modelo NOD/Lt, caracterizado por un elevado porcentaje de células T, que a la cepa C57BL/KsJ. La capacidad de respuesta de los linfocitos T de la cepa NOR/Lt en ensayos de supresión en cultivo mixto, es un intermedio entre la baja respuesta de NOD/Lt y la correcta respuesta de C57BL/KsJ.

Aunque los híbridos F1(NODxNOR) son incapaces de desarrollar diabetes, esta puede inducirse mediante un tratamiento con ciclofosfamida. Se ha demostrado que marcadores en el cromosoma 11, en el intervalo donde residiría Idd-4<sup>357</sup>, aportan al modelo NOR/Lt genes de resistencia a la diabetes del C57BL/KsJ. El modelo NOR/Lt ha adquirido secuencias retrovirales del modelo C57BL/KsJ. Esto podría explicar la inhibición del desarrollo de diabetes por la eliminación de clones de linfocitos T a nivel de timo en presencia de secuencias retrovirales derivadas de C57BL/KsJ.

Todas estas características, hacen del modelo NOR/Lt una cepa control de resistencia del modelo NOD/Lt para el estudio de la contribución de genes no ligados a H-2<sup>97</sup> a la resistencia/susceptibilidad al desarrollo de insulinitis y diabetes.

### **5.3.2 El ratón *nonobese diabetic SCID (NOD-SCID)***

El NOD-SCID es una cepa congénica del modelo NOD. La mutación apareció originalmente en la cepa consanguínea C.B-17<sup>358</sup>. Tras una serie de retrocruzamientos selectivos se transfirió la mutación al fondo genético NOD. La mutación *scid* (*severe combined immunodeficiency*) que se localiza en el cromosoma 16, genera inmunodeficiencia porque existe una alteración en la recombinación V(D)J que impide el desarrollo de linfocitos T y B funcionales

por un mecanismo que todavía se desconoce<sup>359</sup> pero asociado a un defecto en la reparación del DNA<sup>360</sup>. La subunidad catalítica de la proteína-quinasa dependiente de DNA (Prkdc) se ha propuesto como gen candidato de la mutación<sup>361</sup>. Esta mutación presenta una herencia autonómica recesiva y sólo los animales homocigotos presentan el fenotipo inmunodeficiente. Esta cepa es muy susceptible a la aparición de linfomas tímicos que se manifiestan después de las 20 semanas de vida, principalmente en hembras y con una incidencia total del 67%<sup>362</sup>. Estos animales no manifiestan insulinitis ni diabetes.

La inmunodeficiencia severa que presentan estos animales les hace más susceptibles a la infección por microorganismos oportunistas, por lo que es muy importante mantenerlos en condiciones libres de patógenos.

### **5.3.3 El ratón C57BL/6J (B6)**

Cepa consanguínea creada a principios del siglo XX por el Dr C.C. Little. La cepa C57BL/6J es la más usada a nivel mundial para estudios de genética: es la cepa más utilizada para la creación de líneas congénicas y fue escogida por el *International Mouse Sequencing Consortium* para la secuenciación del genoma murino<sup>242</sup>. Es portador de un haplotipo no diabetogénico (H-2<sup>b</sup>) y además esta resistencia le viene conferida en gran parte por otros alelos en su genoma no ligados al MHC. Se utiliza en estudios de diabetes tipo 2 inducida mediante dieta. Es una de las cepas más resistentes al desarrollo de DT1.

## **5.4 Ventajas e inconvenientes del uso de modelos animales en el estudio de la DT1**

Como ya se ha comentado previamente, el uso de modelos animales ha sido la estrategia para el estudio de los procesos que son difíciles de caracterizar en la DT1 humana, en particular los que tienen lugar a nivel insular. La aparición de modelos experimentales espontáneos de la enfermedad ha permitido y permite avanzar en el estudio de la patogénesis de la enfermedad. El uso de modelos animales ha permitido<sup>363</sup>: 1) investigar respuestas inmunes en localizaciones anatómicas de difícil acceso en humanos, como el propio páncreas, los ganglios regionales y el timo, 2) el estudio de la contribución de mutaciones concretas a la enfermedad (*knock-outs*), 3) determinar el papel de ciertos tipos celulares mediante transferencia o

depleción de las células, y 4) determinar posibles terapias (farmacológica, génica o células troncales) y sus mecanismos de acción.

Aunque los mecanismos efectores finales de la destrucción de la célula beta parecen ser similares en humanos y modelos animales, pueden existir diferencias en los mecanismos de inicio y progresión de la enfermedad. El estudio en estos modelos animales, dado que son cepas consanguíneas, equivaldría al estudio de la enfermedad en un rango muy pequeño de la población<sup>364</sup>. Por eso, los resultados de un modelo animal habría que compararlos con otro, ya que cada modelo refleja de forma similar sólo ciertos aspectos de la enfermedad humana. Existen grandes diferencias entre roedores y humanos a nivel del sistema inmune, tanto en la inmunidad innata como adquirida<sup>365</sup>. Se han descrito más de 80 diferencias que afectan, entre otros mecanismos posiblemente implicados en el desarrollo de la enfermedad, a la presentación antigénica y a los procesos de selección tímica. Existen numerosas coincidencias, pero también diferencias, en las características de la DT1 entre los modelos más utilizados: el ratón NOD y la rata BB, y la enfermedad humana (**Tabla 17**).

**Tabla 17.** Similitudes y diferencias en la DT1 entre humanos y los modelos animales más utilizados en el estudio de la enfermedad.

CARACTERÍSTICA	HUMANOS	RATÓN NOD	RATA BB
Predisposición genética ligada al MHC	+	+	+
Predisposición genética ligada a otros genes de susceptibilidad	+	+	+
Efectos ambientales sobre la penetrancia genética	probable	+	+
Incidencia	0,25-0,40%	30-80%	90%
Predisposición por sexos	NO	H>M	NO
Defectos en la inmunoregulación periférica	+	+	+
Reactividad humoral a los islotes	+	+	NO
Autoantígeno iniciador de la respuesta	desconocido	desconocido	desconocido
Insulinitis caracterizada por células T	+	+	+
Infiltración de otros órganos	A veces	+	+
Cetoacidosis diabética	NO	Leve	NO
Enfermedad transmisible por transferencia de médula ósea	+	+	+
Terapias preventivas	NO	+ (>195)	+

Recientemente se ha cuestionado si el uso de animales para el estudio de la DT1 es útil ya que después de años de investigación intensiva, aún falta por definir el autoantígeno que inicia la enfermedad, los mecanismos que conducen a la destrucción de la célula beta y el diseño de terapias preventivas o terapéuticas efectivas<sup>366</sup>. Por todo esto, los estudios que se llevan a cabo en animales en relación a la DT1 habría que corroborarlos en otros modelos animales, en otros ambientes y teniendo en cuenta las diferencias genéticas e inmunológicas que existen entre las diferentes especies.

## 6. Antecedentes del estudio

En 1979 se describió una expresión anormal de IFN de tipo 1 en el suero de pacientes con enfermedades autoinmunes<sup>367</sup>. En 1994 nuestro grupo tuvo la oportunidad de estudiar en profundidad el páncreas de un paciente que falleció durante el inicio clínico de la DT1<sup>124</sup>. El estudio inmunohistológico demostró presencia de infiltrado leucocitario, hiperexpresión de HLA de clase I (pero no de clase II), TAP-1<sup>126</sup> e ICAM-1<sup>368</sup> (moléculas implicadas en el procesamiento antigénico y reconocimiento inmunológico). En el estudio del perfil de citocinas, mediante RT-PCR, se detectó la presencia de citocinas proinflamatorias de respuesta antiviral, lo que sugería que podría existir una infección vírica en ese páncreas.

Por otro lado, la administración de IFNs de tipo I para el tratamiento de ciertas patologías, se han relacionado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes, particularmente DT1<sup>369,370,371</sup>.

En cuanto a modelos animales, el modelo transgénico que expresa IFN-alfa en las células beta pancreáticas desarrolla diabetes<sup>328</sup> y esta citocina también está implicada en el desarrollo de la diabetes inducida por STZ en ratones y en la rata BB<sup>372</sup>. En 1998 el grupo de la Dra Fátima Bosch publicó los resultados de un estudio realizado en un modelo transgénico en el fondo genético C57BL6/SJL, que expresaba IFN-beta humano bajo el promotor de la insulina de rata en las células beta pancreáticas<sup>329</sup>. Este modelo fue retrocruzado tres veces con la colonia *outbred* CD-1. Los resultados del estudio fueron los siguientes:

- La secreción de insulina *in vitro* se redujo hasta un 50% en presencia de IFN-beta tras un estímulo con dosis crecientes de glucosa, lo que indica

una alteración del metabolismo de la célula beta *in vitro* en presencia de esta citocina.

- La adición *in vitro* de IFN-beta (tanto murino como humano), a islotes en cultivo, induce un aumento de la expresión de  $\beta_2$ -microglobulina que sugiere una hiperexpresión de MHC de clase I.
- Se confirmó mediante RT-PCR, un aumento de la expresión de  $\beta_2$ -microglobulina en los islotes de ratones transgénicos, lo que supone una hiperexpresión de MHC de clase I en los islotes de estos animales.
- Cultivos de islotes de ratones transgénicos mostraron una reducción en la secreción de insulina frente a un estímulo con glucosa respecto a sus controles, así como una reducción en el contenido de cAMP.
- Este modelo transgénico muestra una leve hiperglicemia, una baja insulinemia y un aumento de los triglicéridos en suero respecto a su control. Además, la glucosa no vuelve a su valor basal después de tres horas tras la administración peritoneal para la prueba de tolerancia a la glucosa, lo que sugiere un estado pre-diabético.
- La administración de múltiples dosis bajas de estreptozotocina produce una marcada reducción del número de células beta y la presencia de insulinitis en el 50% de los animales transgénicos en background C57Bl6/SJL.
- El retrocruzamiento a la colonia CD-1 implica que la administración de múltiples dosis bajas de estreptozotocina produzca insulinitis en el 100% de los animales en N1. En N3 un 9% de los animales desarrolla un estado diabético espontáneamente con infiltración de los islotes.

Los datos preliminares, la disponibilidad del modelo y nuestra hipótesis, llevaron a la realización del presente trabajo para caracterizar el efecto del IFN-beta en la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

### ***Consideraciones previas***

Entre los factores ambientales relacionados con la DT1, las infecciones víricas podrían actuar como desencadenantes del proceso autoinmune. Esta hipótesis se basa en evidencias indirectas: incidencia estacional de la enfermedad, la presencia de IgM específicas para algunos virus en el suero de pacientes de nuevo diagnóstico, la detección de IFNs de tipo 1 (citocinas antivirales) en páncreas de pacientes diabéticos, la presencia de RNA de enterovirus en el suero de pacientes diabéticos, el aislamiento de un virus del páncreas de un paciente diabético y varios estudios en modelos animales experimentales.

### ***Hipótesis***

La expresión de la citocina antiviral IFN-beta en los islotes pancreáticos podría inducir una situación inflamatoria local, que atraería células leucocitarias y variaría la expresión de moléculas implicadas en el reconocimiento antigénico, favoreciéndose la pérdida de tolerancia inmunológica hacia las células beta y dando lugar a una diabetes autoinmune.





## OBJETIVOS DEL ESTUDIO

### **General**

Estudiar el papel del IFN-beta en los fenómenos que conducen a la destrucción de las células beta pancreáticas en la DT1.

### **Concretos**

1. Transferir el transgén del fondo genético CD-1 a los *backgrounds* genéticos NOD y NOR y generar el modelo transgénico inmunodeficiente NOD-SCID RIP-HuIFN-beta.
2. Determinar el momento de inicio y la incidencia de la enfermedad en los modelos transgénicos generados en los diferentes fondos genéticos.
3. Definir el carácter autoinmune de la enfermedad:
  - 3.1 Descartando una posible alteración del metabolismo de la célula beta causada por el efecto tóxico directo del transgén y/o su producto.
  - 3.2 Caracterizando el grado de insulitis y su composición (tipos celulares que componen los infiltrados insulares), así como posibles variaciones de expresión de moléculas implicadas en el reconocimiento inmunológico.
  - 3.3 Transfiriendo la enfermedad mediante trasplante de esplenocitos o linfocitos infiltrantes pancreáticos de animales diabéticos a ratones NOD inmunodeficientes
4. Caracterizar las alteraciones que IFN-beta produce en los islotes a nivel de morfología, inflamación y moléculas relacionadas, así como determinar si su expresión altera el microambiente tímico.
5. Determinar el efecto de IFN-beta en las subpoblaciones linfocitarias a nivel de órgano diana (páncreas) y periférico (ganglios regionales pancreáticos y bazo) en animales sanos y diabéticos.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Animales

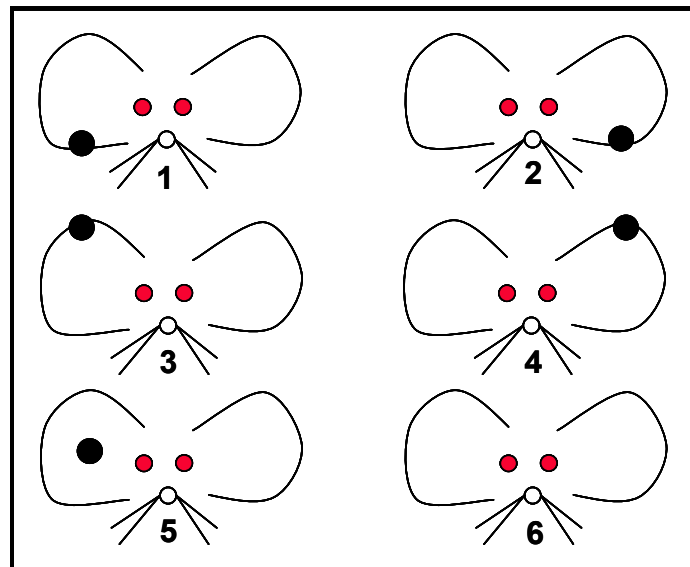
#### 1.1 Procedencia

Los sujetos de estudio han sido ratones (*Mus musculus*). Los ratones transgénicos que expresan interferón beta humano en las células beta pancreáticas (RIP-HuIFN-beta) fueron generados y cedidos por la Prof. Fátima Bosch, CBATEG, Universidad Autónoma de Barcelona (UAB)<sup>329</sup>. El *background* genético de estos ratones transgénicos era CD-1 y se cruzaron entre ellos para obtener individuos homocigotos para el transgén. La colonia CD-1 que usamos como control (*wild type*) proviene de Charles River Laboratories (Sta Perpetua de la Mogoda, Barcelona, España). El motivo por el que estos ratones transgénicos expresan IFN-beta humano y no murino, es que los animales generados en 1990 expresando IFN-beta murino no eran viables por el potente efecto tóxico de la citocina debido a que se expresaba bajo un promotor muy potente (Dr T.A. Stewart, Genentech, San Francisco, CA, comunicación personal). Los animales originales se mantuvieron en el animalario de la UAB en condiciones de estabulación convencional. Para el estudio de la inmunología de DT1 es imprescindible que los animales se mantengan en condiciones libres de patógenos específicos (*Specific Pathogen Free*, SPF), para esto se realizó una transferencia o rederivación embrionaria (Dr. C. Desvignes, Transgenic Animal Department, Charles River Laboratories, Lyon, Francia). Los ratones NOD, NOR y NOD-SCID provienen de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). La cepa C57BL/6J (B6) se ha obtenido de Harlan Interfauna Ibérica (Sant Feliu de Codines, España). Todos estos animales se han estabulado en la colonia libre de patógenos del Centro de Experimentación Animal del Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, inaugurada en Junio de 2000. Estos animales se han mantenido en ciclo de luz de 12 h luz/ 12 h oscuridad, con temperatura constante y dieta estándar y agua *ad libitum*. Para el control del estado sanitario de la colonia, se han realizado semestralmente necropsias, parasitologías, bacteriologías y serologías de ratones centinela según las recomendaciones FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Association*).

### 1.2 Identificación

A los 21 días de vida, cuando se separan de la madre, los animales son identificados con una muesca en la oreja realizada con un instrumento cortante (Panlab S.L., Cornellà, Barcelona, España). En cada jaula hay como máximo 6 ratones que se identifican con el siguiente criterio (**Figura 10**):

- nº 1 = oreja derecha y orificio inferior
- nº 2 = oreja izquierda y orificio inferior
- nº 3 = oreja derecha y orificio superior
- nº 4 = oreja izquierda y orificio superior
- nº 5 = oreja derecha y orificio central
- nº 6 = sin marca



**Figura 10.** Esquema de la identificación de los animales

### 1.3 Seguimiento y sacrificio de los animales

A los animales se les realiza un control diario para detectar signos clínicos de diabetes, los síntomas más marcados son poliuria y polidipsia. El lecho de la jaula está mojado porque aumenta el volumen de micción del individuo y el nivel del agua de bebida disminuye porque el animal afectado bebe mucho más (**Figura 11**). Se realiza una glucosuria con tiras de bioquímica seca (Menarini Diagnósticos S.A., Sant Adrián de Besós, Barcelona, España). Si dos tiras consecutivas muestran un resultado positivo ( $>250$  mg/100 ml) se considera al animal diabético y se procede a su sacrificio para su posterior estudio. El sacrificio se realiza mediante anestesia inhalatoria con halotano

(Fluothane, AstraZéneca, España) más posterior dislocación cervical una vez anestesiado.



**Figura 11.** Ratón NOD diabético. El lecho de la jaula aparece más mojado de lo que sería habitual.

#### 1.4 Genotipado del transgén

Para identificar los animales transgénicos, se utiliza la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir de DNA genómico. El DNA se extrae de un pequeño fragmento de cola de aproximadamente 3 mm de longitud. El tejido se mantiene en nieve carbónica y se disgrega mecánicamente. Se procede a la extracción de DNA mediante el protocolo de DNAzol<sup>®</sup> Reagent (Life Technologies, Inchinnan, Paisley, U.K.). Se añaden 150  $\mu$ m de DNAzol<sup>®</sup> Reagent y se homogeniza. Se centrifuga a 16.000xg y el sobrenadante se transfiere a otro tubo estéril. Se realizan dos lavados con etanol: el primero con etanol absoluto y el segundo con etanol 70°. Se deja evaporar el etanol restante (aprox. 10'). El DNA se resuspende en una solución de 50  $\mu$ l NaOH 8mM + 3  $\mu$ l Hepes 1M y se cuantifica en el espectrofotómetro (Pharmacia LKB-Ultrospec III) a 260 $\lambda$ . La concentración se calcula según la fórmula:

$$\mu\text{g de DNA}/\mu\text{l} = \frac{\text{absorbancia a } 260\lambda \times 50 \times \text{factor de dilución}}{1000}$$

El DNA se mantiene a 4°C hasta su uso para la reacción de PCR (**Tabla 18**).

Los *primers* específicos para la determinación de HuIFN-beta (Sigma-Genosys Ltd., Cambridge, U.K.), se han diseñado en dos zonas del transgén

que presentan baja homología con el IFN-beta murino para evitar reacciones cruzadas:

- HuIFN-beta sense (382U)                   ATTGCTCTCCTGTTGTGCTT
- HuIFN-beta antisense (964L)           TGCTGGTTGAAGAATGCT

**Tabla 18.** Reacción de PCR para determinación del transgén.

Reactivo	Concentración final
buffer MgCl <sub>2</sub> free (Biotools B & M Labs, Madrid, Spain)	1 mM
MgCl <sub>2</sub> (Promega)	1,5 mM
dNTPs	1 mM
primer sense (382U)	0,5 μM
primer antisense (964L)	0,5 μM
DNA	200 ng/tubo
H <sub>2</sub> O	hasta 20 μl

Se añaden 25 μl de aceite mineral (Sigma, St Louis, MI) en cada tubo para evitar pérdidas por evaporación durante el proceso en la termocicladora.

En la termocicladora (Perkin Elmer 480) la reacción se inicia con un *hot start* a 94°C durante 4 minutos. Se añade la polimerasa (Biotools B & M Labs, Madrid, España) a razón de 0,25 U/tubo y se inicia el ciclado:

95° 30"	}	x30 ciclos
60° 30"		
72° 35"		
72° 7'		

Estas condiciones fueron optimizadas para estos *primers* con una termocicladora de gradientes (iCycler, BioRad). Una vez acabado el proceso se realiza una electroforesis en gel de agarosa (Ecogen S.R.L., Barcelona, España) al 2% a 90V durante 30 minutos.

Todas las reacciones incluyen 3 controles:

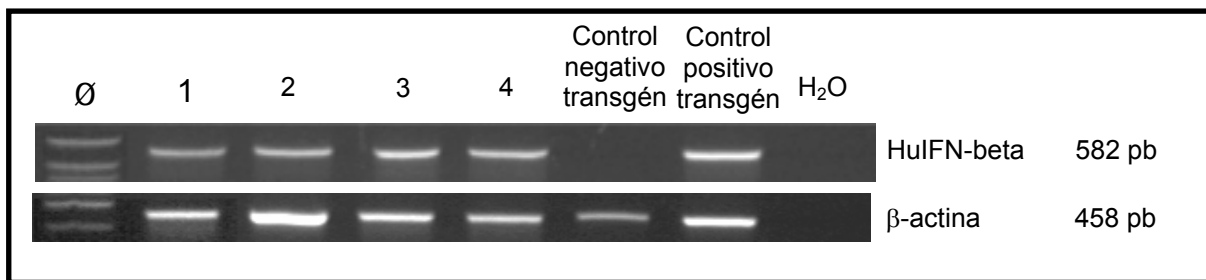
- positivo para el transgén
- negativo para el transgén (ej. CD-1)
- H<sub>2</sub>O

Las muestras positivas para el transgén generan una banda de 582 pb (Figura 12).

Para validar las muestras, realizamos una PCR con *primers* para un gen constitutivo:  $\beta$ -actina, adaptados a las mismas condiciones de PCR que los específicos para el transgén. Los *primers* (Sigma-Genosys Ltd., Cambridge, U.K.) utilizados son:

- $\beta$ -actina *sense*                      GTTACCAACTGGGACGACA
- $\beta$ -actina *antisense*                  TGGCCATCTCCTGCTCGAA

Las muestras positivas para el gen constitutivo tienen un tamaño de banda de 458 pb (**Figura 12**)



**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% para determinar las bandas correspondientes a HulfN-beta y  $\beta$ -actina.

### **1.5 Transferencia del transgén a diferentes fondos genéticos: NOD y NOR RIP-HulfN-beta, seguimiento mediante microsatélites.**

Para establecer una colonia de animales que expresen IFN-beta humano en las células beta pancreáticas en los fondos genéticos NOD y NOR, se han diseñado retrocruzamientos entre individuos transgénicos CD-1 e individuos NOD y/o NOR (vease apartado: Modelos Animales, 1.2 Cepa congénica). Para acelerar el proceso de adquisición de la genética deseada, se ha llevado a cabo un seguimiento de los animales positivos para el transgén de cada camada mediante microsatélites, y posterior selección de los individuos que hayan heredado mayor cantidad de marcadores de la nueva cepa. Estos animales se seleccionan como progenitores para el siguiente retrocruzamiento. Los microsatélites son secuencias mono, di, tri o tetraméricas repetidas múltiples veces en tándem. La variación alélica se basa más en el número de repeticiones presentes en el tándem que en un cambio específico de pares de bases. Existen elevados niveles de polimorfismo entre cepas y esto permite una monitorización genética y como resultado una aceleración en el proceso de consolidación de una cepa<sup>373</sup>. Existen marcadores microsatélites asociados a insulinitis y diabetes que se emplean para determinar el carácter diabetogénico



de un individuo o cepa. Mediante PCR del DNA de la cola del ratón, se analizaron 23 microsatélites para cada animal, con el fin de seleccionar los marcadores que resultaran en diferencias del tamaño del amplímero entre NOD/NOR y CD-1 (**Tablas 19 y 20**).

**Tabla 19.** Marcadores microsatélites utilizados para determinar diferencias entre NOD, NOR y CD-1.

Idd/cromosoma	Marcador microsatélite	Tamaño relativo
Idd1/17	D17Mit34	CD-1=NOD=NOR
Idd2/9	D9Mit25.1	CD-1=NOD=NOR
Idd2/9	D9Mit25.2	CD-1=NOD=NOR
Idd3/3	D3Mit206	CD-1=NOD=NOR
Idd3/3	D3Mit206.1	CD-1=NOD=NOR
Idd3/3	D3Nds36	NOD=NOR>CD-1
Idd3/3 (IL-2)	D3Nds6	CD-1>NOD=NOR
Idd3/7	D7Nds36	CD-1>NOD=NOR
Idd4/11	D11Mit115	CD-1=NOD=NOR
Idd4/11	D11Mit320	CD-1>NOD>NOR
Idd5/1	D1Mit24	NOR >NOD>CD-1
Idd5/1	D1Mit26	CD-1=NOD=NOR
Idd6/6	D6Mit52	CD-1>NOD=NOR
Idd6/6	D6Mit374	CD-1=NOD=NOR
Idd7/7	D7Mit20	CD-1>NOD=NOR
Idd7/7	D7Nds6	CD-1=NOD=NOR
Idd10/3	D3Mit103	CD-1=NOD=NOR
Idd11/4	D4Mit202	NOD>CD-1>NOR
Idd12/14	D14Nds3	CD-1>NOD=NOR
Idd13/2	D2Mit17	CD-1=NOD=NOR
Idd13/2	D2Mit107	CD-1>NOD=NOR
Idd15/5	D5Mit48	CD-1=NOD=NOR
Idd15/5	D5Mit69	CD-1>NOD=NOR

[www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)

**Tabla 20.** Reacción de PCR para determinación de microsatélites.

Reactivo	Concentración final
buffer MgCl <sub>2</sub> <i>free</i> (Promega)	1 mM
MgCl <sub>2</sub> (Promega)	1,5mM
dNTPs	1 mM
primer <i>sense</i>	1 μM
primer <i>antisense</i>	1 μM
DNA	200 ng/tubo
H <sub>2</sub> O	hasta 25 μl

Se añaden 25 μl de aceite mineral (Sigma) y tras *hot start* a 80°C, se añade el enzima Taq Polimerasa (Promega) a razón de 1,25 U/tubo y se inicia el ciclado. Las condiciones de PCR son:

95 °C	1'	
55 °C	1'	x35 ciclos
72 °C	1'	
72 °C	7'	

Se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 4% a 70v durante 3,5-4 horas. Los amplímeros tienen un tamaño entre 100-250 pb. Una vez seleccionados los marcadores que ofrecen diferencias entre cepas, se estudian en los hermanos de camada transgénicos positivos y se seleccionan aquellos con mayor número de marcadores positivos para el *background* genético deseado como progenitores de la siguiente generación. A partir de N5 todos los marcadores microsatélites eran positivos para el fondo genético de interés, pero los retrocruzamientos se han realizado hasta N10 para asegurar el 100% de genoma de interés. Una vez en N10, los hermanos de camada se han cruzado entre sí para obtener individuos homocigotos.

### 1.6 Cepa NOD-SCID RIP-HuIFN-beta

Una vez establecida la cepa NOD RIP-HuIFN-beta se han diseñado una serie retrocruzamientos para obtener animales inmunodeficientes (NOD-SCID) que expresen IFN-beta humano en las células beta pancreáticas. Para esto, se han cruzado ratones NOD RIP-HuIFN-beta con NOD-SCID y a los

descendientes se les ha determinado la presencia del transgén mediante PCR y la presencia de la mutación SCID mediante PCR y posterior reacción de restricción (**Tabla 21**). La reacción de PCR para la mutación SCID que amplifica subunidad catalítica de la proteína-quinasa dependiente de DNA (Prkdc), da un producto de 79 pb. Después de la digestión con el enzima ALU I: los productos de los alelos salvajes son bandas de 68 y 11 pb y los productos de la mutación SCID son bandas de 38, 28 y 11 pb. Los animales de la primera generación son heterocigotos para la mutación SCID, por eso para obtener animales en homocigosis para esta mutación, se retrocruzan otra vez (**Figura 13**).

**Tabla 21.** Primers, reacción de PCR y reacción de restricción para la detección de la mutación SCID.

**Secuencia de los primers**

Primer	Secuencia 5'-3'	Producto reacción
oIMR0803 (sense)	GGAAAAGAATTGGTATCCAC	79 pb
oIMR0804 (antisense)	AGTTATAACAGCTGGGTTGGC	

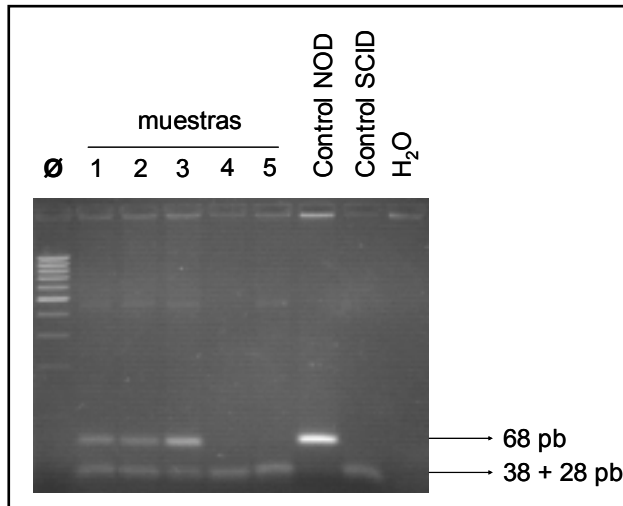
**Reacción de PCR**

Reactivo	Concentración final	Volumen
buffer MgCl <sub>2</sub> free (Promega)	1 mM	
MgCl <sub>2</sub> (Promega)	2,5 mM	
dNTPs	0,2 mM	
oIMR0803	1 μM	
oIMR0804	1 M	
DNA		2 μl
H <sub>2</sub> O	hasta 20 μl	
Taq Polimerasa (Promega)	0,0125 U/μl	

**Reacción de Restricción**

Reactivo	Concentración final	Volumen
Producto de PCR		6 μl
Buffer de ALU I 10x	1x	
BSA 10mg/ml		0,12 μl
ALU I		1 μl
H <sub>2</sub> O	0,5 U/μl	5,68 μl

Esta mezcla de la reacción de restricción se incubó 2 horas a 37°C y se inactivó el enzima durante 15 minutos a 65 °C. Posteriormente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Ecogen) al 3% para determinar el tamaño relativo del amplímero.



**Figura 13.** Producto de la reacción de restricción del producto de PCR para la mutación SCID con el enzima ALU I.

### 1.7 Comité Ético de Experimentación Animal

Todos los procedimientos realizados con animales de experimentación durante el desarrollo de este trabajo de investigación, han sido aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona, donde se ha llevado a cabo este estudio.

## 2. Seguimiento metabólico

### 2.1 Glicemias

Se han determinado los niveles de glucosa en sangre en animales CD-1 transgénicos (n=10) y en sus controles (n=9). Las determinaciones han realizado desde el momento del destete hasta las 20 semanas de vida, una vez por semana siempre a la misma hora y previo ayuno de 2 horas para evitar al máximo variaciones interindividuales por ingesta de alimento. La medida se realiza mediante un pinchazo en la zona más caudal de la cola del animal y la concentración de glucosa en sangre se mide con un glucotest. Se considera un ratón diabético cuando su glicemia es superior a 360 mg/dl en una sola determinación o bien superior a 198 mg/dl en dos determinaciones consecutivas.

## **2.2 Radioinmunoensayo determinar la concentración de insulina**

### **2.2.1 Insulinemia**

Se ha determinado la concentración de insulina en suero de animales CD-1 y CD-1 RIP-HuIFN-beta de 4, 6, 9, 12, 15 y 18 semanas, tres machos y tres hembras de cada edad. La sangre se extrae mediante punción cardíaca de los animales una vez sacrificados. La sangre se centrifuga a 16.000xg durante 2 minutos y se separa el suero, que se congela a -20 °C hasta la determinación de la concentración de insulina mediante radioinmunoensayo (RIA) utilizando el Rat Insulin RIA kit (LINCO Research Inc., St Charles, MO) y la lectura se realiza con un contador  $\gamma$ . Los resultados se expresan como insulinemia: ng insulina/ml de suero

### **2.2.2 Contenido pancreático de insulina**

Para determinar el contenido pancreático de insulina se han analizado páncreas de 15 animales CD-1 y 10 CD-1 RIP-IFN-beta. Se extrae el páncreas tras laparotomía del animal previamente sacrificado y se corta un fragmento de la cabeza del páncreas de aproximadamente 15 mg. Se mantiene en hielo, con 1 ml de ácido-etanol y se homogeniza mecánicamente con un polytron (Kinematika AG, Littau, Suiza). Se mantiene a -20°C durante toda la noche. Se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos y se diluyen 50  $\mu$ l de sobrenadante en 2,5 ml de tampón borato con 0,2% BSA (Sigma-Aldrich Chemie GMBH, Steinheim, Germany). Esta dilución x50 se puede conservar a 20°C varios meses. Para la determinación de la insulina se emplea una dilución x100 en tampón borato. Se utiliza el mismo kit de RIA que en el apartado anterior. Los resultados se expresan como contenido pancreático de insulina: ng insulina/g páncreas.

## **2.3 Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa**

El test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa se ha realizado en condiciones de ayuno en animales control (NOR y NOD-SCID) y transgénicos (NOR RIP-HuIFNbeta y NOD-SCID RIP-HuIFNbeta) adultos. Se ha obtenido una muestra de sangre de la vena de la cola para medir la glicemia basal (tal como se indica en el apartado 2.a). Posteriormente, se ha administrado a cada animal una inyección intraperitoneal de 2 mg de glucosa por g de peso vivo. Los niveles de glucosa en sangre se han determinado a los 15, 30, 60, 120 y

210 minutos después de la inyección. Los resultados se expresan como glicemia media (mg de glucosa/dl de suero)  $\pm$  error estándar de la media de cada grupo de animales.

### 3. Determinación de IFN-beta humano

Se han cuantificado los niveles de IFN-beta humano en el suero de 5 animales CD-1 y 7 animales CD-1RIP-HuIFN-beta, mediante un kit comercial de ELISA específico de IFN-beta humano (Fujirebio Inc., Tokio, Japón) que no presenta reacciones cruzadas con el IFN-beta murino. Para obtener el suero, se extrae sangre mediante punción cardíaca de los animales una vez sacrificados. La sangre total se centrifuga a 16.000xg durante 2 minutos y se separa el suero, que se congela a  $-20$  °C hasta la determinación. Los resultados se expresan como UI de HuIFN-beta/ ml.

### 4. Inmunohistología

Para determinar el grado de insulitis y caracterizar las poblaciones que componen el infiltrado insular, se ha utilizado respectivamente: histología y tinción con hematoxilina/eosina (H/E) e inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos para insulina y diferentes poblaciones leucocitarias.

#### 4.1 Determinación del grado de insulitis

Para determinar el grado de infiltración de los islotes en los diferentes animales se utiliza un índice denominado *insulitis score*<sup>374</sup>. Partimos de bloques de páncreas congelados en isopentano en un baño de acetona con nieve carbónica. El páncreas se extrae tras laparotomía del animal una vez sacrificado y se congela en isopentano enfriado en baño de acetona y nieve carbónica durante 3 minutos. En el criostato se realizan cortes seriados de 5  $\mu$ m en al menos 3 niveles diferentes del páncreas asegurándonos que al menos hay 20 islotes para analizar. Las secciones se tiñen con H/E según el siguiente protocolo:

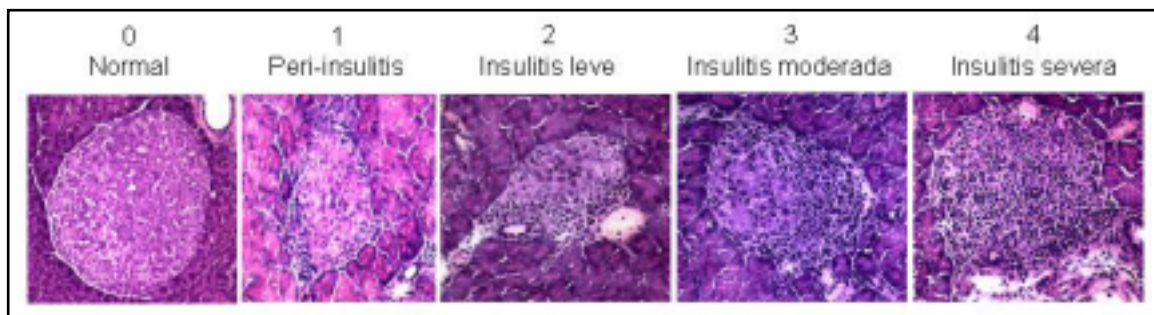
- 2 minutos en hematoxilina
- lavado con agua del grifo
- 30 segundos en eosina
- 10 segundos en alcohol de 70°

- 10 segundos en alcohol de 90°
- 2 minutos en alcohol absoluto
- 1 minuto en xilol (MERCK, Darmstadt, Germany)

Las secciones se montan con DPX (BDH Laboratory Supplies, Poole, Reino Unido) y se observan al microscopio contando como mínimo 20 islotes por animal y haciendo un promedio de cada islote de lo que se observa en los cortes consecutivos de cada porta. Al observar el infiltrado de un islote, se establece un rango de 0 a 4 según el criterio:

- **0** islote no infiltrado
- **1 peri-insulitis**, como mínimo 6 células infiltrantes se localizan alrededor del islote
- **2 insulitis leve**, menos de un 25% del islote está infiltrado
- **3 insulitis moderada**, entre un 25% y un 75% del islote está infiltrado
- **4 insulitis severa**, más del 75% del islote está infiltrado

**Figura 14.** Grados de insulitis para el cálculo de la *insulitis score*.



Para calcular el grado de infiltración o *insulitis score* de un animal aplicamos la fórmula:

$$\text{insulitis score} = \frac{(0 \times A) + (1 \times B) + (2 \times C) + (3 \times D) + (4 \times E)}{\text{n}^\circ \text{ islotes totales}}$$

en la que:

A = n° de islotes normales

B = n° de islotes con peri-insulitis

C = n° de islotes con insulitis leve

D = n° de islotes con insulitis moderada

E = n° de islotes con insulitis severa

Se han analizado los páncreas de 6 animales (3 machos y 3 hembras) de cada fondo genético. Las edades de estudio son: 4, 6, 9, 12, 15 y 18

semanas de edad en la colonia CD-1. De esta forma se abarca un período que va desde el momento del destete hasta animales adultos. En las cepas NOD RIP-HuIFN-beta y NOR RIP-HuIFN-beta se ha analizado 3 edades: 6, 9 y 12 semanas de edad. De cada uno de los modelos transgénicos se ha utilizado hermanos de camada no transgénicos a las mismas edades como controles.

#### **4.2 Caracterización de la insulitis**

Para determinar qué tipo de células forman el infiltrado se ha realizado doble inmunofluorescencia indirecta. Se han estudiado secciones de 12 animales de cada grupo. Para cada individuo y marcaje se han analizado un mínimo de 5 islotes. Partimos secciones de 5  $\mu\text{m}$  de bloques de tejido congelado. Las incubaciones con los distintos anticuerpos se realizan en una cámara oscura y húmeda a temperatura ambiente. Los anticuerpos se diluyen en FACS buffer:

- PBS 1x (Roche)
- 1% de FCS (Gibco, Invitrogen Corporation, Paisley, Reino Unido)
- ázida sódica al 0,1%

En primer lugar se incuban los anticuerpos con los marcadores específicos (**Tabla 22**) *overnight* a 4 °C. Después de dos lavados con FACS buffer de ocho minutos cada uno, se añade el anticuerpo secundario (**Tabla 22**) marcado con FITC durante 30 minutos. A continuación, se realiza una tinción para localizar el islote y con un anticuerpo anti-insulina (cobaya anti-insulina, Sigma) que se incubaba durante 90 minutos y tras los lavados, se añade el anticuerpo secundario rodaminado (cabra anti-cobaya rodaminado, ICN biomedical GmbH, Postfach, Alemania) y se deja incubar durante 30 minutos. Después de los lavados, se monta la preparación con Fluoroprep (bioMérieux S.A., Marcy l'Etoile, Francia). Se observa el tejido en un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss AG, Bernried, Alemania), las células marcadas con rodamina se observan de color rojo y en verde las células marcadas con fluoresceína. Las secciones se analizan con el programa de tratamiento de imagen Openlab 2.1.1. (Improvision, Coventry, Reino Unido).



**Tabla 22.** Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia indirecta sobre secciones de páncreas.**ANTICUERPOS PRIMARIOS**

<b>Marcador</b>	<b>Anticuerpo</b>	<b>Referencia</b>
Panleucocitario	CD18	Becton Dickinson
Células T	CD3 Molecular Complex	Becton Dickinson
CD4	Hibridoma GK1.5,	ATCC TIB-207
CD8	Hibridoma 53-6.72	ATCC TIB-105
Células B	Hibridoma RA3-3A1/6.1	ATCC TIB-146
Macrófagos	Hibridoma M1/70.15.11.5.HL	ATCC TIB-128
Células Dendríticas	Hibridoma 33D1	ATCC TIB-227
MHC-I	Hibridoma M1/42.3.9.8.HLK	ATCC TIB-126
MHC-II	NIMR-4	Southern Biotechnology Associates, Inc
HuIFN- $\beta$	Sheep (polyclonal) anti-human IFN- $\beta$	Biosource International
Insulina	Guineapig anti-Insulina	Sigma

**ANTICUERPOS SECUNDARIOS**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Referencia</b>
Goat anti-Guinea PigTRITC	INC Biomedicals GmbH
Goat anti-Rat FITC	Southern Biotechnology Associates, Inc
Rabbit anti-Sheep FITC	Zymed Laboratories, Inc

**4.3 Detección de apoptosis**

La muerte celular programada o apoptosis es la forma más común de muerte celular eucariota. La endonucleólisis se considera un evento bioquímico clave en este proceso que da como resultado la rotura del DNA nuclear en fragmentos de doble cadena y bajo peso molecular (mono y oligonucleosomas) así como fragmentos de una sola cadena ('nicks') de alto peso molecular. Una inapropiada regulación de este proceso puede jugar un papel importante en varias condiciones patológicas como podría ser la autoinmunidad.

Para determinar la presencia de células apoptóticas en los islotes de los páncreas de individuos transgénicos y sus controles, se utilizó la técnica de *TdT-mediated dUTP nick end labelling* o TUNEL (Roche). Se utilizaron tanto páncreas de individuos sanos como diabéticos y como control positivo se utilizó el timo de un ratón CD-1 de 6 semanas. Esta técnica se basa en una reacción

enzimática *in situ* en la que la DNA polimerasa así como la transferasa terminal de deoxinucleótidos (TdT) se usan para la incorporación de nucleótidos marcados al extremo 3' hidroxil terminal de los fragmentos de DNA.

Las muestras utilizadas son secciones de criostato de páncreas de 5  $\mu\text{m}$ . Se han analizado muestras de dos animales por edad (4, 6, 9, 12, 15 y 18 semanas) y colonia, con una media de 5 islotes/animal (60 islotes por grupo) Como control positivo se utilizó una sección de timo de un animal de 6 semanas.

Las secciones se secan durante 30 minutos, se fijan 20 minutos con paraformaldehído al 4% y se hace un lavado de 20 minutos con PBS en agitación. Los portaobjetos se colocan en hielo para permeabilizar las muestras con 0,1% Tritón + 0,1% 3 citrato sódico durante 6 minutos. Se lavan 2 veces durante 5 minutos con PBS. Se añaden los reactivos para la reacción TUNEL: 5  $\mu\text{l}$  de TdT + 45  $\mu\text{l}$  de dUTP por corte. El control negativo es un corte al que sólo se añade 50  $\mu\text{l}$  de dUTP. Las secciones se incuban a 37°C en cámara húmeda. Se realizan 2 lavados de 5 minutos con PBS y una agitación energética. Se añaden 35  $\mu\text{l}$  de Converter por muestra y se incuba 30 minutos a 37 °C. Se realiza un lavado de 10 minutos en PBS. Se prepara un sustrato cromogénico: 2 mg naftol fosfato + 0,2 ml dimetilformamida + 9,8 ml Tris 0,1M pH=8,2 + 2,4 mg levimasol + 10 mg fast-red que se filtra directamente sobre el corte y se deja que aparezca el color (rojizo) aproximadamente 15 minutos. Se lava 10 minutos en PBS. Se hace una contratinción con Hematoxilina. Se lava 2 minutos con agua del grifo y después 3 minutos en PBS. Se monta la preparación con Fluoroprep (bioMérieux S.A.) y se observa al microscopio con luz visible. Las células apoptóticas se observan de color rojo sobre un fondo azul.

## 5. Morfometría de los islotes

Durante el estudio inmunohistológico de los páncreas de estos animales, se realizó una observación inicial en la que los islotes del modelo transgénico parecían tener mayor tamaño que los de los controles. Para determinar el papel del H<sub>1</sub>FN-beta en un posible aumento de tamaño de los islotes, se ha llevado a cabo una serie de determinaciones: peso del páncreas, área de los islotes,

área de las células beta y grado de replicación de las mismas, en los dos grupos de animales (CD-1 y CD-1 RIP-HuIFN-beta).

### **5.1 Masa pancreática**

Se ha determinado el peso del páncreas, tras su extracción, de 10 animales de 12 semanas de cada grupo y se ha correlacionado con el peso vivo del animal.

### **5.2 Área de los islotes**

El tamaño de los islotes de cada grupo (controles CD-1, n=10 y CD-1 RIP-HuIFN-beta, n=12) se ha analizado mediante la determinación del área en  $\mu\text{m}^2$  con el programa informático de tratamiento de imagen Openlab 2.1.1 (Improvision). Las muestras que se han utilizado son secciones de páncreas de 5  $\mu\text{m}$  teñidas con H/E.

### **5.3 Área de las células beta**

Como estudio preliminar se ha analizado el tamaño de las células beta de 2 animales por colonia (8 islotes por animal). Para eso se mide el área correspondiente a la masa celular beta y determina el número de núcleos incluidos en ella con el programa de tratamiento de imagen Openlab 2.1.1. (Improvision). El área media celular se ha establecido como la división entre el área total y el número de núcleos totales incluidos en esta área.

### **5.4 Replicación de las células beta**

Para determinar el grado de replicación de las células beta del páncreas se han comparado 2 grupos de animales de 12 semanas: controles (CD-1, n=2) y transgénicos CD-1 RIP-HuIFN-beta (n=2). La 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU, Sigma Immunochemicals) es un análogo de la timidina que se incorpora al DNA sintetizado de nuevo de células en la fase S del ciclo celular<sup>375</sup>.

Para esta técnica se inyecta a los sujetos de estudio una dosis de 100 mg BrdU/kg de peso vivo intraperitonealmente a una concentración 10 mg BrdU/ml de PBS estéril. Seis horas después de la inyección, se procede al sacrificio, sangrado y extracción de órganos de los animales. El páncreas diseccionado se limpia, se pesa y se fija en una solución de paraformaldehído al 4 % durante 16-24 h a 4 C°. Transcurrido este tiempo se deshidrata durante

un tiempo similar en sacarosa al 30% a igual T<sup>a</sup>. Posteriormente se mantienen las muestras en tampón fosfato hasta su inclusión en parafina. Se realiza una tinción doble en secciones de 3µm con inmunoperoxidasa para BrdU y un cóctel de anticuerpos para teñir todo el islote excepto las células beta (somatostatina, glucagón y polipéptido pancreático). De cada sujeto se obtiene también una sección de intestino delgado en las mismas condiciones, como control positivo ya que es un tejido con un elevado nivel de replicación. De cada islote se cuentan el total de células beta para realizar un porcentaje de las que son positivas para la tinción de BrdU.

## **6. Cuantificación relativa de las subpoblaciones linfocitarias: citometría**

### **6.1 Procesamiento del bazo**

Se eutanasia al animal y tras laparotomía, se extrae el bazo. El tejido se mantiene en suero fisiológico estéril frío y se transfiere a una placa de petri con 2 ml de buffer de hemólisis para lisar los eritrocitos que haya en la suspensión celular. Con dos portaobjetos se disgrega mecánicamente el bazo en el buffer de hemólisis. La suspensión celular se traslada a un tubo de 15 ml de fondo cónico y se incuba durante 6 minutos. El estroma del bazo y las partes menos disgregadas sedimentarán en el fondo del tubo. Se recoge el sobrenadante, que contiene los leucocitos y se añade a un tubo falcon de 50 ml donde previamente habrá 20 ml de HBSS. Se centrifuga a 580xg durante 6 minutos. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el botón celular en 10 ml de HBSS. Se realiza una tinción con azul tripano para realizar un conteo celular y determinación de la viabilidad de la muestra en cámara de Neubauer. En cada tubo para inmunofluorescencia directa en suspensión se incluyen  $5 \times 10^5$  células.

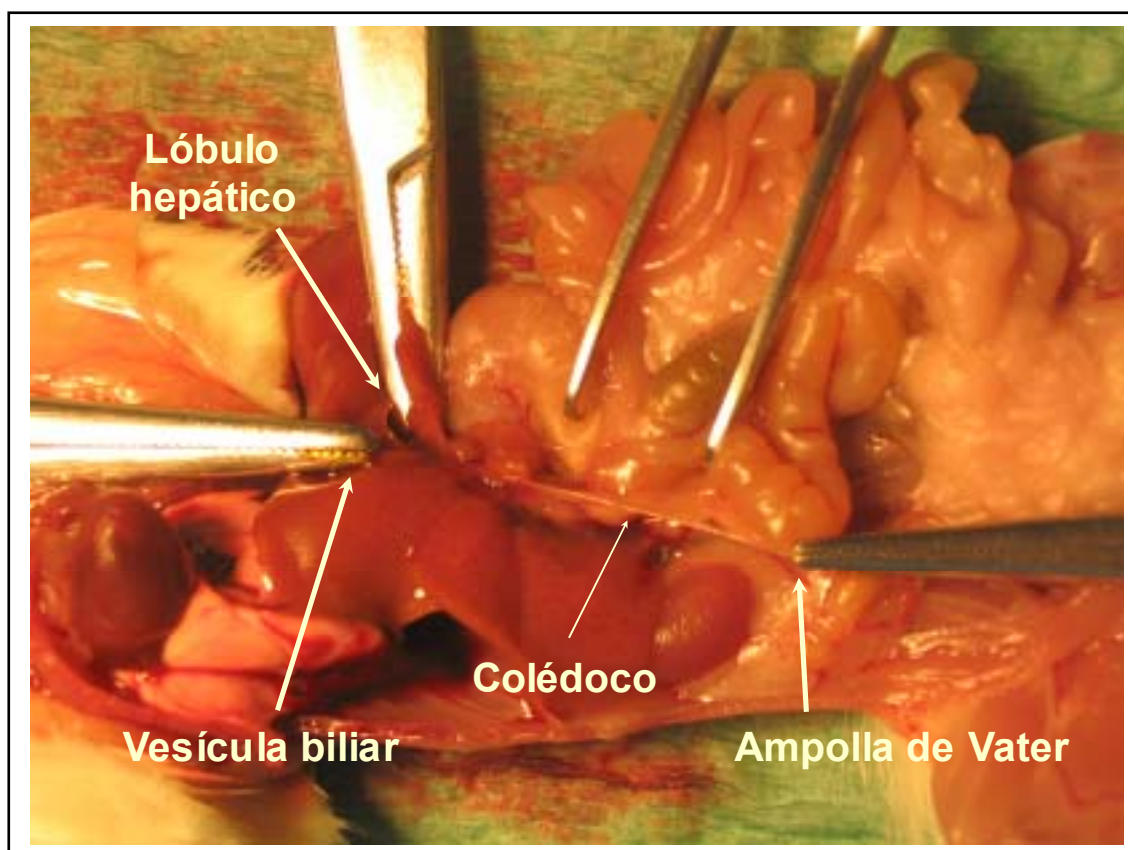
### **6.2 Procesamiento de los ganglios regionales pancreáticos**

Se eutanasia al animal y se realiza una laparotomía para localizar los ganglios regionales pancreáticos en la zona de la cabeza del páncreas, en la curvatura del duodeno. Se realiza una disgregación mecánica con dos portaobjetos en una placa de petri con suero fisiológico. Se lleva a cabo un recuento y viabilidad de la muestra en la cámara de Neubauer con azul tripano.

La muestra se distribuye en los tubos de citometría para tinción de inmunofluorescencia directa en suspensión.

### 6.3 Procesamiento del páncreas

Una vez eutanasiado el animal, se coloca en decúbito supino y se limpia toda la zona abdominal con etanol 70%. Se hace una incisión ventral, se retira la piel y se incide en la cavidad abdominal. Se aparta el paquete intestinal hacia el lado izquierdo del animal y se localiza la unión de conducto biliar con el duodeno. Con pinzas tipo mosquito se pinza la ampolla de Vater, la vesícula biliar y el lóbulo hepático caudal izquierdo. Se canula el colédoco con una aguja de 30G y se inyecta una solución de colagenasa (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ): 470U de colagenasa / ml de HBSS, hasta que el páncreas está completamente distendido (**Figura 15**).



**Figura 15.** Preparación quirúrgica para inyección de colagenasa en el colédoco.

Se disecciona el páncreas, se transfiere a un tubo y se incuba a 37°C durante 20 minutos para digerir el páncreas. Tras la digestión, se coloca el tubo en hielo y se añaden 10 ml de HBSS frío para parar la reacción enzimática. Con una pipeta de 10 ml, a la que previamente se ha seccionado la punta para

que quede de forma irregular, se disgrega mecánicamente el digerido pancreático. Se añaden 10 ml de HBSS y se sedimenta 10 minutos para permitir que el tejido más pesado, donde se incluyen tejido exocrino e islotes, se deposite en el fondo del tubo. Se recoge el sobrenadante, donde encontraremos los leucocitos y se pasa a través de un filtro de 30  $\mu\text{m}$ . Se realiza un gradiente de ficoll con la suspensión celular (4 ml de ficoll + 10 ml de suspensión celular). Se centrifugan a 400xg durante 20 minutos con una aceleración de 6 y sin freno. Se recoge la interfase y se realiza un lavado con HBSS a 580xg durante 6 minutos. Se resuspende el botón celular en 2 ml de HBSS y se reparte en los tubos de citometría.

#### 6.4 Inmunofluorescencia directa en suspensión

Añadimos 1 ml de FACS buffer a cada tubo de citometría con su muestra correspondiente y centrifugamos a 580xg durante 6 minutos. Descartamos el sobrenadante y añadimos el anticuerpo marcado con fluorocromo correspondiente a una dilución 1/100 en FACS buffer (**Tabla 23**). Las muestras se resuspenden y se incuban durante 20 minutos a oscuras y temperatura ambiente. Se realiza un lavado con FACS buffer centrifugando a 580xg durante 6 minutos. Las muestras se resuspenden en 250  $\mu\text{l}$  de FACS buffer y se analizan en un citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson, San José, CA).

**Tabla 23.** Relación de anticuerpos contra marcadores leucocitarios utilizados para inmunofluorescencia directa en suspensión.

	Anticuerpos		
<b>Tubo 1, panleucocitario</b>	-	-	CD45 TC (Caltag Laboratories, Burlingame, CA)
<b>Tubo 2, linfocitos T</b>	CD4 FITC (Pharmingen, San Diego, CA)	CD8 PE (Pharmingen)	CD45 TC
<b>Tubo 3, linfocitos B</b>	-	CD19 PE (Pharmingen)	CD45 TC
<b>Tubo 4, células NK y NKT</b>	CD3 FITC (Caltag Laboratories)	CD49b PE (Pharmingen)	CD45 TC

## 7. Transferencia adoptiva de la enfermedad

Los experimentos de transferencia de la enfermedad se han realizado inyectando esplenocitos ( $15-30 \times 10^6$  linfocitos/200  $\mu$ l suero fisiológico) o linfocitos infiltrantes de páncreas ( $1 \times 10^6$  linfocitos/200  $\mu$ l SF) de animales diabéticos de las cepas NOD, NOD RIP-HuIFN-beta y NOR RIP-HuIFN-beta a receptores inmunodeficientes NOD-SCID o NOD-SCID RIP-HuIFN-beta. Como control negativo se ha inyectado suero fisiológico a los animales receptores.

Se han transferido esplenocitos o linfocitos infiltrantes de páncreas de NOD RIP-HuIFN-beta diabéticos a animales adultos sanos de la cepa NOD RIP-HuIFN-beta para determinar si se produce una aceleración de la enfermedad. Para descartar el carácter diabetogénico de los linfocitos de la cepa NOR, se han inyectado esplenocitos de animales de esta cepa a receptores NOD-SCID. Las células se procesan como se explica en los apartados 6.a y 6.c en condiciones de esterilidad. La viabilidad de los linfocitos se determina con azul de tripano y sólo se transfieren aquellas preparaciones cuya viabilidad es  $>80\%$ . La transferencia se realiza mediante una inyección intravenosa en la vena de la cola y al menos en tres animales por condición. Los animales se monitorizan mediante medición de glucosuria tres veces por semana para determinar el desarrollo de DT1 durante 30 semanas.

## 8. PCR a tiempo real (RT-PCR)

Esta técnica permite una monitorización activa de la PCR mediante la detección y cuantificación de un marcador fluorescente. Esta técnica se puede utilizar en muestras con muy pocas copias del gen diana por su elevada sensibilidad. La fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la cantidad del producto de la reacción y esto nos permite monitorizarla en la fase exponencial, cuando el producto de PCR se correlaciona con la cantidad de material inicial. La cuantificación que se ha realizado ha sido relativa, por lo que se ha normalizado respecto a un gen de referencia.

### **8.1 Cuantificación de expresión génica mediante RT-PCR con el sistema LightCycler®**

Dado que la expresión del transgén está bajo el promotor de la insulina, su expresión podría darse también en tимо, donde es sabido que se expresan

antígenos insulares<sup>12</sup>. Esta expresión podría hacer variar la tolerancia central de forma que afectara al desarrollo de autoinmunidad. Para determinar si existen diferencias en la expresión de ciertas moléculas a nivel de timo y de páncreas en el grupo de animales transgénicos y sus controles, se ha realizado una cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real utilizando el fluorocromo intercalante SYBR® Green I (Roche) en el equipo LightCycler® (Roche). Las muestras utilizadas son páncreas y timos de 4 individuos de 6 semanas de edad de cada grupo y un órgano control (hígado). Las curvas patrón para cada molécula se han diseñado a partir de producto de RT-PCR purificado, precuantificado y posteriores diluciones seriadas de este.

### **8.1.1 Extracción de RNA**

El material de partida son bloques de tejido congelado. Para procesar las muestras se realizan secciones en el criostato hasta obtener aproximadamente 20 mg de tejido. Para la extracción de RNA se ha usado un *kit* comercial: TriZOL Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Se añade 1 ml de TriZOL a cada tubo y se deja incubar a T<sup>a</sup> ambiente durante 5 minutos. Posteriormente se añaden 200 µl de cloroformo y se agitan vigorosamente durante 15 minutos. Después de dejarlas 3 minutos a T<sup>a</sup> ambiente durante, se centrifugan a 12000xg durante 5 minutos a 4 °C y se obtienen 3 fases: una acuosa superior donde se encuentra el RNA, una interfase que corresponde al DNA y una fase inferior donde se encuentran las proteínas. Se transfiere la fase acuosa a otro eppendorf al que se añaden 500 µl de isopropanol y se agita suavemente. Se deja 10 minutos a T<sup>a</sup> ambiente y se centrifuga a 12000xg durante 10 minutos a 4 °C, tras lo que se obtiene un pellet visible. Eliminamos el sobrenadante y añadimos 1 ml de Etanol al 75% en agua DEPC. Agitamos y se centrifuga a 7500g durante 5 minutos a 4 °C. Se elimina el alcohol y secamos el pellet al aire durante 10 minutos. Se resuspende el pellet en 35-50 µl de agua DPCE.

Se ha realizado un tratamiento con DNAsa para evitar contaminación con DNA genómico. Se utiliza el kit comercial DNA free® (Ambion Inc, Huntingdon, Reino Unido) que elimina por debajo de 10 µg de DNA/ml. Se añaden 0,1 volúmenes de tampón de DNAsa y 2 unidades de DNAsa I. Se mezcla cuidadosamente y se incuba durante 40 minutos a 37 °C. Se añaden



0,1 volúmenes del reactivo de inactivación de la DNAsa y tras agitación, se incuba 2 minutos a T<sup>a</sup> ambiente moviendo de vez en cuando para homogeneizar la mezcla. Se centrifuga a 1000g durante 1 minuto y el sobrenadante, donde se encuentra el RNA, se transfiere a otro tubo.

El RNA se cuantifica y se determina su pureza:

- cantidad=  $A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 0,04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
- pureza=  $A_{260} / A_{280}$

Se considera una pureza óptima de RNA aquella entre 1,8-2,1

Se realiza un gel desnaturizante para determinar la integridad de RNA extraído.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
• H <sub>2</sub> O destilada	53 ml
• Agarosa	0,6 g
• MOPS 10x	6 ml
• Formaldehído 37%	1 ml

Se calienta el H<sub>2</sub>O destilada y la agarosa. Antes de que se enfríe se añade el resto de reactivos.

Para preparar las muestras:

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
• Formamida 100%	10 $\mu\text{l}$
• Formaldehído 37%	3 $\mu\text{l}$
• MOPS 10x	2 $\mu\text{l}$
• RNA	5 $\mu\text{l}$

Para desnaturizar el RNA:

- 5 minutos a 68 °C
- 5 minutos a 4 °C

Se añade a cada muestra 0,8  $\mu\text{l}$  de bromuro de etidio (BrEt) y 0,8  $\mu\text{l}$  de tampón de carga 5x.

Se realiza una electroforesis del gel 45 minutos a 70V. Se comprueba la integridad del RNA mediante determinación de las bandas correspondientes al RNA ribosómico 18s y 28s.

### 8.1.2 Retrotranscripción.

En este punto, mediante una reacción enzimática, el RNA se retrotranscribe a cDNA de cadena simple para ser amplificado por PCR. Esto se produce mediante la hibridación de un cebador con la cola poly-A y la actuación de una DNA polimerasa dependiente de RNA.

En un primer paso se desnaturalizan 4  $\mu\text{g}$  de RNA en agua DPEC a 68  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Las muestras se mantienen en hielo (4  $^{\circ}\text{C}$ ) durante otros 5 minutos para evitar la formación de estructuras secundarias.

**Tabla 24.** Reacción de retrotranscripción de las muestras de RNA.

Reactivo	Concentración final
buffer de M-MLV 5x (Promega)	1x
dNTPs 10 mM	1 mM
Oligo-DT 10 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{M}$
RNA sin (40 U/ $\mu\text{l}$ ) (Promega)	1 U/ $\mu\text{l}$
MMLV (200 U/ $\mu\text{l}$ ) (Promega)	10 U/ $\mu\text{l}$
RNA	0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (4 $\mu\text{g}$ total)
agua DPEC	hasta 20 $\mu\text{l}$

La mezcla se incuba a 42  $^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Para inactivar la acción del enzima se mantiene la reacción 15 minutos a 70  $^{\circ}\text{C}$ . En este momento el cDNA se puede usar como molde para la amplificación por PCR.

### 8.1.3 Primers, curvas patrón y condiciones de RT-PCR

Se ha cuantificado la expresión de  $\beta$ -actina,  $\beta_2$ -microglobulina, preproinsulina I, preproinsulina II, glucagón y HuIFN-beta a nivel de páncreas, timo e hígado mediante PCR a tiempo real con *primers* específicos (**Tabla 25**)

**Tabla 25.** Primers para RT-PCR con el sistema *Light-Cycler®*

Gen	Primer sense	Primer antisense
$\beta$ -actina	GTTACCAACTGGGACGACA	TGGCCATCTCCTGCTCGAA
$\beta_2$ -microglobulina	CCGGAGAATGGGAAGC	GTAGACGGTCTTGGGC
Preproinsulina I	ACTTCCTACCCCTGCT	CCAAGGTCTGAAGGTCC
Preproinsulina II	CCCTGCTGGCCCTGCTCTT	CTGCTCCCGGGCCTCCAC
Glucagón	CAGACAGAAGCGCATG	TGGCCCTCCAAGTAAGA
Hu-IFN-beta	TCACCAGGGGAAAACCTC	CAGTCACTTAAACAGCATCT

El diseño de los primers se ha realizado con el programa LightCycler Probe Design, Versión 1.0 (Roche). La curva patrón para cada par de primers se ha establecido partiendo de producto de RT-PCR purificado y precuantificado, utilizando diluciones seriadas.

**Tabla 26.** Reacción de RT-PCR para el sistema *Light-Cycler*

Reactivo	Concentración final	Volumen
SYBR® Green I		2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	3 mM	
Primer <i>sense</i>	0,5 $\mu$ M	
Primer <i>antisense</i>	0,5 $\mu$ M	
cDNA		2 $\mu$ l de a una dilución 1/5 de la muestra original
H <sub>2</sub> O destilada		hasta llegar a 20 $\mu$ l

**Tabla 27.** Ciclos de T<sup>a</sup> y tiempo que se aplican en la reacción de RT-PCR

DESNATURALIZACIÓN	AMPLIFICACIÓN	MELTING	ENFRIADO
95 °C 10 min	95 °C 15s 62 °C 10s 72 °C 10s	95 °C 73 °C 15 s 95 °C	40 °C

#### 8.1.4 Interpretación de los resultados

Los resultados se expresan como la media de los cocientes entre los valores específicos del marcador respecto a la expresión del gen constitutivo ( $\beta$ -actina) en el mismo tejido y su correspondiente error estándar.

## **8.2 Microdissección láser y cuantificación génica mediante RT-PCR con el sistema ABI Prism 7000®**

Dada la dificultad para obtener tejido endocrino puro de los animales transgénicos, particularmente de los diabéticos, ha utilizado la técnica de microdissección láser (*laser capture microdissection*, LCM) para recuperar el tejido de interés.

### **8.2.1 Obtención de la muestra: microdissección láser**

Para obtener el tejido insular, endocrino y/o infiltrado, se ha utilizado la técnica de LCM usando el equipo PALM® MicroBeam (P.A.L.M Microlaser Technologies, Bernried, Alemania) de la Universidad de Tuebingen (Alemania). El tejido de partida han sido criosecciones de 6 µm de páncreas en portaobjetos especiales (P.A.L.M Microlaser Technologies) con una membrana de polietilen-naftalato (PEN). A estos portaobjetos se les realiza un tratamiento previo antes de fijar el tejido:

- Se cubren los portaobjetos con RNase-ZAP (Ambion Inc), tratamiento para RNAsas
- Se realizan dos lavados con agua DEPC
- Se secan a 37°C durante dos horas
- Se dejan 30 minutos en luz ultravioleta (254 nm) durante 30 minutos, para conseguir que las membranas de PEN sean más hidrofílicas y el tejido se adhiera mejor.
- Se sumergen los portas en poly-L-lysine (0,1% w/v) durante cinco minutos
- Se realizan dos lavados con agua DEPC y se dejan secar 30 minutos.

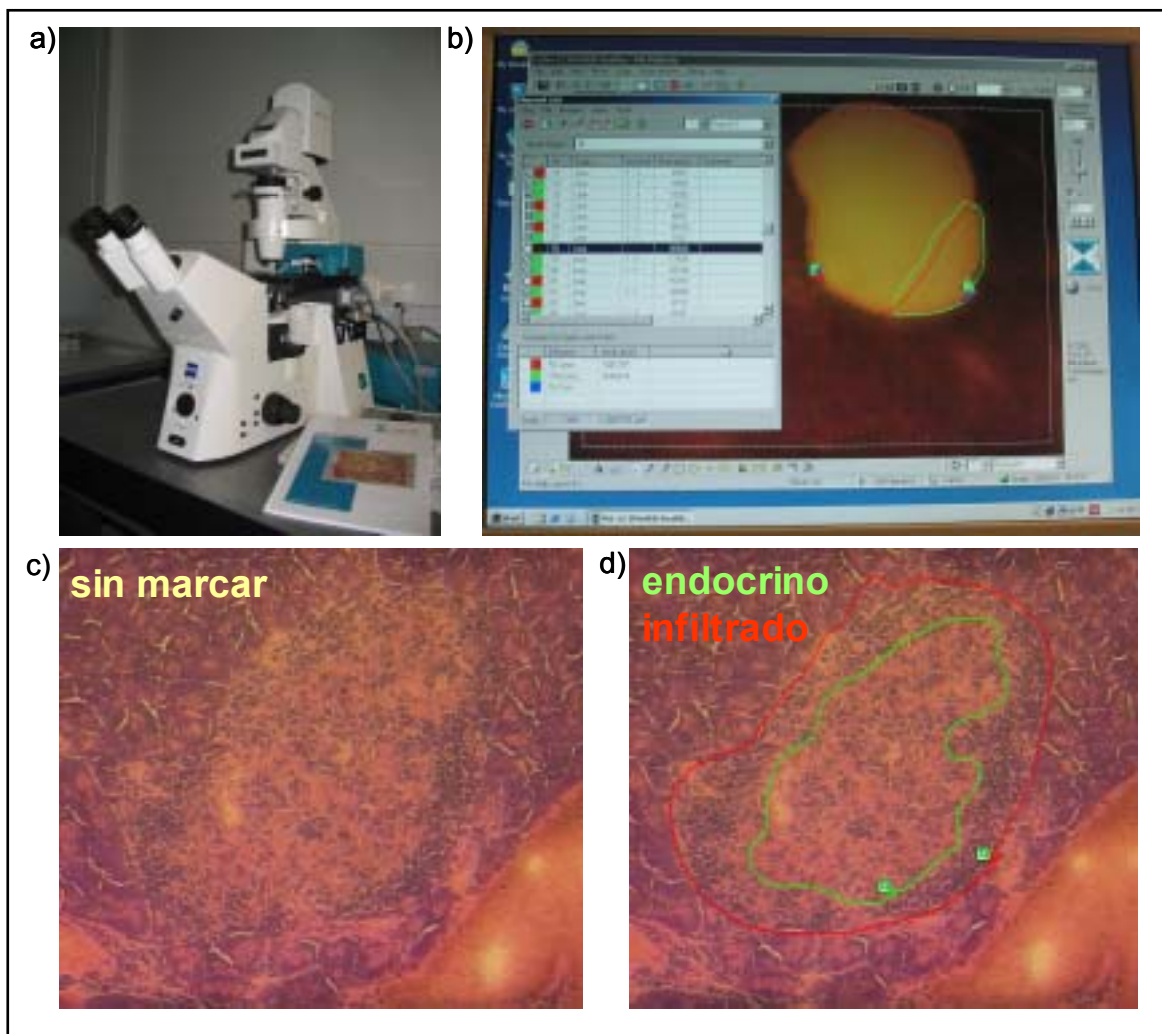
Se realizan criosecciones de 6 µm que se distribuyen por todo el porta, aproximadamente hay unas de 15 secciones/porta en función del tamaño del páncreas. Los portas se mantienen a -80°C hasta el momento de realizar la tinción de H/E para seguidamente proceder a la LCM. El protocolo de tinción:

- cinco minutos en etanol absoluto a -20 °C durante
- lavado con agua del grifo
- cinco minutos con hematoxilina
- lavado con agua del grifo, dejándola caer sobre los portas al menos 3 minutos para que al hematoxilina restante se elimine bien

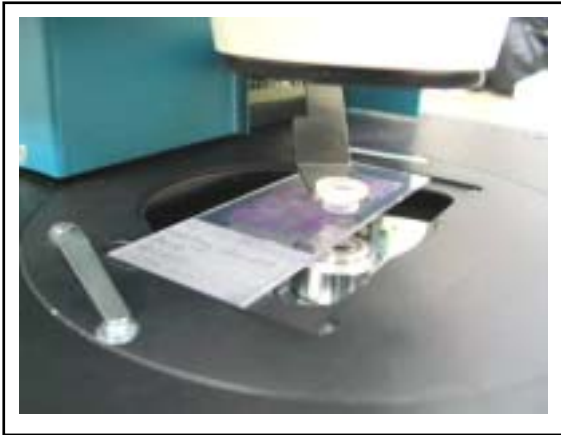
- tres minutos con eosina
- Lavados en concentración creciente de etanol: 10 segundos en alcohol de 90°, 10 segundos en alcohol de 90°, 10 segundos en alcohol de 100° y cinco minutos en alcohol de 100°.

Cuando las secciones están secas, se procede a realizar la microdissección láser. El portaobjetos se fija al microscopio (Carl Zeiss AG) y con el software (PALM@robo) se seleccionan todas las áreas de interés, distinguiendo las zonas de endocrino e infiltrado con diferentes colores (**Figura 16**).

**Figura 16.** Equipo de microdissección láser. a) Microscopio Zeiss, b) Software PALM@robo con el que se seleccionan las áreas de tejido de interés para microdissección y catapultado. c) Secciones de páncreas teñidas con H/E donde se observa d) el tejido endocrino seleccionado en verde y el área de infiltrado en rojo.



En un tapón de tubo eppendorf de 0,5 ml se depositan 8-10  $\mu$ l de agua DEPC para que las secciones catapultadas se mantengan. Este tapón se coloca en el brazo del microscopio y se sitúa a aproximadamente 1 mm encima del porta (**Figura 17**).



**Figura 17.** Posición del tapón de eppendorf en el brazo del microscopio para recogida de las secciones catapultadas.

Una vez seleccionadas todas las áreas de interés, se procede a la microdissección y catapultado mediante un láser que emite a 1064 nm. Una vez acabado este proceso se ajusta el tapón a un eppendorf con 300  $\mu$ l de solución de lisis. Para recuperar el tejido primero se realizan varios movimientos de inversión en el eppendorf y se lleva a centrifugar a 16.000xg durante 2 minutos. Se han analizado muestras de páncreas de tres animales de cada cepa y condición (**Tabla 28**).

**Tabla 28.** Cepas de ratones analizados mediante LCM y posterior RT-PCR. Se han utilizado tres animales de cada cepa.

ANIMALES	CONDICIÓN	MUESTRA OBTENIDA
NOD RIP-HuIFN-beta	sano	Endocrino + infiltrado
NOD	sano	Endocrino + infiltrado
NOD RIP-HuIFN-beta	diabético	Islotes (incluye infiltrado)
NOD diabéticos	diabético	Islotes (incluye infiltrado)
NOD-SCID	sano	Islotes
NOD-SCID RIP-HuIFN-beta	sano	Islotes
C57	sano	Islotes

### 8.2.2 Extracción del RNA

La extracción de RNA de las muestras se ha realizado con el *kit* comercial RNeasy<sup>®</sup> Micro (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante para aislamiento de RNA de muestras de microdissección de tejido congelado.

### 8.2.3 Retrotranscripción

La retrotranscripción del RNA se ha llevado a cabo con el siguiente protocolo:

- Se añaden 2  $\mu\text{l}$  de *radom hexamer* a cada muestra y se desnaturalizan 10 minutos a 70°C
- Se prepara la mezcla para la reacción de retrotranscripción que tendrá un volumen final de 30  $\mu\text{l}$  (**Tabla 29**)

**Tabla 29.** Mastermix para reacción de retrotranscripción

Reactivo	Concentración final	Volumen
RT-buffer 5x	1x	6 $\mu\text{l}$
DTT 0,1M	10mM	3 $\mu\text{l}$
dNTPs 10mM	2mM	6 $\mu\text{l}$
RNAsin (40U/ $\mu\text{l}$ ) (Promega)	0,66U	0,5 $\mu\text{l}$
SuperScript II (200 U/ $\mu\text{l}$ ) (Invitrogen)	3,33U	0,5 $\mu\text{l}$

- A cada tubo de reacción se añaden los 12  $\mu\text{l}$  de muestra (RNA) y se incuba 10 minutos a T<sup>a</sup> ambiente, 55 minutos a 42 °C y finalmente, 15 minutos a 70 °C para inactivar las enzimas. Después se mantienen en hielo.

### 8.2.4 Primers y RT-PCR

Se ha determinado la expresión de las moléculas detalladas en la **Tabla 31** a nivel insular. Para la detección del producto de PCR se han utilizado SYBR® Green que se une al DNA de doble cadena y con una excitación emite luz de forma que a medida que se acumula el producto de PCR, se incrementa la fluorescencia.

**Tabla 30.** Reacciones de PCR para el sistema ABI Prism 7000® utilizando SYBR® Green

<b>Mastermix SYBR® Green</b>		
<b>Reactivo</b>	<b>Concentración final</b>	<b>Volumen</b>
Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK)		7,5 µl
Primer sense	0,25 µM	
Primer antisense	0,25 µM	
H <sub>2</sub> O		0,9 µl

En cada reacción de PCR se utilizan 5 µl de la solución de cDNA (1/10)

**Tabla 31.** *Primers* utilizados para la reacción de RT-PCR de muestras obtenidas mediante LCM

<b>PRIMERS</b>		
<b>Gen</b>	<b>Primer sense</b>	<b>Primer antisense</b>
18s	CGGCTACCACATCCAAGGAA	GCTGGAATTACCGCGGCT
TLR-2	GCCACCATTTCACGGACT	GGCTTCCTCTTGGCCTGG
TLR-3	GTGAGATACAACGTAGCTGACTG	TCCTGCATCCAAGATAGCAAGT
TLR-4	CCTCTGCCTTCACTACAGAGACTT	TGTGGAAGCCTTCCTGGATG
TLR-9	CCTGAAGTCTGTACCCCGTT	ACGAAGTCGGAGTTGTGC
H60	GAGCCACCAGCAAGAGCAAG	CCAGTATGGTCCCCAGATAGC
RAE-1	TGGCCAAGGCAGCAGTG	CGTTGGTGTATCCATAGCTCAGTAG
MULT-1	GTCTGCTGCTTCACATAGTGC	CTAACAATGGCGTATCCTGTG
IFN-gamma	AGCGGCTGACTGAACTCAGATTG TAG	GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG

### 8.2.5 Interpretación de los resultados

Los resultados se expresan como una cuantificación relativa siguiendo el método de la  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ <sup>376</sup>. En este método se eliminan las curvas estándar y se expresa respecto a un gen de referencia. Primero se calcula la diferencia entre los valores  $C_T$  (umbral del ciclo, *cycle threshold*) del gen problema y el de referencia ( $\Delta C_T$ ). Normalmente el de referencia tiene una expresión más elevada lo que indica un  $C_T$  más bajo. Se escoge una de las muestras como referencia (línea de fondo) para hacer las comparaciones. El cálculo de  $\Delta\Delta C_T$  implica el cálculo de la diferencia entre el  $\Delta C_T$  de cada muestra y el  $\Delta C_T$  de la muestra



referencia. El último paso consiste transformar esos valores en valores absolutos, la fórmula para esto es:  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , indica el nivel de expresión comparativa.

## 9. Bloqueo de la enfermedad mediante inmunoterapia

Para estudiar la importancia de las células NK en la aceleración de la enfermedad en este modelo transgénico, se ha estudiado el efecto de la inactivación de esta población mediante bloqueo con un anticuerpo policlonal.

Dado que los animales en *background* genético NOD carecen del marcador NK1.1 en las células NK, se ha inyectado un anticuerpo policlonal de conejo que reconoce el gangliósido asialo ganglio-N-tetraosilceramida (AGM1) (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canadá), que es un marcador altamente expresado en las células NK de todas las especies animales<sup>377</sup>. Se ha demostrado que este anticuerpo bloquea la actividad de la población de células NKs en varias líneas de ratones, entre ellas en la cepa NOD<sup>378,379</sup>. Este anticuerpo policlonal se ha administrado a 6 animales transgénicos en el fondo genético NOD. Según un protocolo previamente descrito, se ha administrado a los ratones 50  $\mu$ l equivalente a 300 $\mu$ g de anticuerpo vía intraperitoneal a los 10, 14 y 18 días de vida. A los ratones control (n=7) se ha administrado igual cantidad (300 $\mu$ g) de suero normal de conejo (*Normal Rabbit Serum, NRS*, Calbiochem, Darmstadt, Alemania) a la misma edad y por la misma vía. A todos los animales inyectados se les ha hecho un seguimiento estándar para determinar el desarrollo de la enfermedad (ver apartado 1. Animales, 1.3 Seguimiento y sacrificio de los animales).

## 10. Estadística

Para el análisis estadístico de los datos se ha usado el programa GraphPad Prism versión 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Las medias de los diferentes grupos se han comparado utilizando el test t-Student cuando la distribución de las muestras es normal y las varianzas son estadísticamente iguales. Para comparar medias de muestras no paramétricas se ha utilizado el test de Mann-Whitney. Para comparar tres o más grupos de medias se ha utilizado el test One-way ANOVA

con el test posterior de Tukey-Kramer para comparación de grupos con diferente número de muestras.

Para analizar la correlación entre de muestras se ha utilizado el test de correlación de Pearson para muestras que siguen una distribución normal.

## RESULTADOS

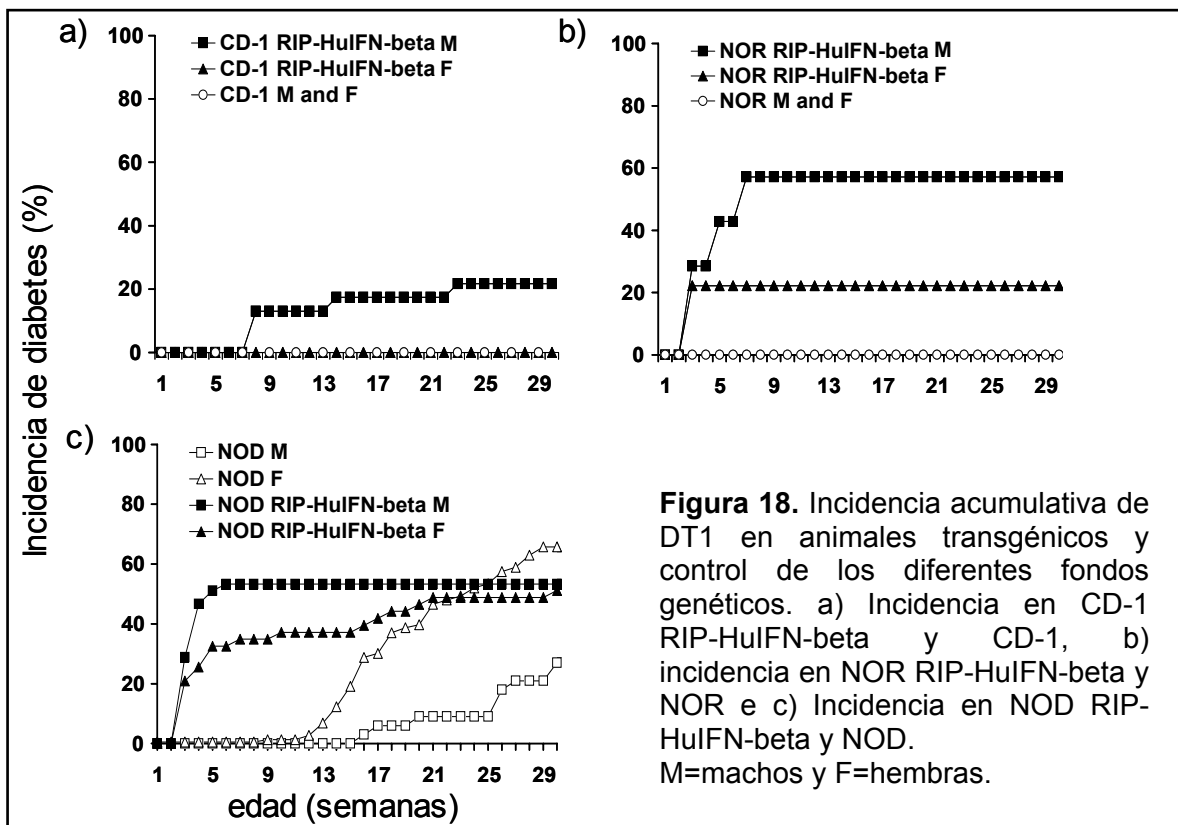
### 1. Incidencia de la enfermedad

Se ha determinado la incidencia de la enfermedad en los animales transgénicos CD-1 RIP-HuIFN-beta, NOR RIP-HuIFN-beta, NOD RIP-HuIFN-beta, NOD-SCID RIP-HuIFN-beta, F1(NOD RIP-HuIFN-beta x C57BL/6J) y sus respectivos controles (**Figura 18**).

- En la cepa *outbred* CD-1 RIP-HuIFN-beta, un 22% de los machos han desarrollado la enfermedad a partir de las siete semanas hasta el final del estudio a las 30 semanas de edad. Ninguna hembra de este grupo ha desarrollado DT1.
- En el grupo NOR-RIP-HuIFN-beta el 56% de los machos y el 22% de las hembras desarrollaron la enfermedad a partir de las 3 semanas de vida, coincidiendo con el momento del destete, en un seguimiento realizado hasta las 30 semanas de edad. Todos los casos han aparecido antes de las 8 semanas de vida.
- En el grupo NOD-RIP-HuIFNbeta el 53% de los machos y el 51% de las hembras desarrollaron DT1 a partir de las 3 semanas de vida, coincidiendo con el momento del destete en un seguimiento realizado hasta las 30 semanas de edad. Mientras que el inicio clínico en los machos se produce siempre antes de las 6 semanas de edad, en el caso de las hembras se produce escalonadamente desde el momento del destete hasta las 30 semanas de vida.
- la incidencia en la cepa NOD ha sido de 27% en machos y 66% en hembras, a partir de las 12 semanas y en un seguimiento hasta las 30 semanas de edad.
- Ninguno de los animales de las cepas control CD-1 y NOR han desarrollado la enfermedad durante el seguimiento hasta las 30 semanas de vida.

- Ninguno de los animales de los grupos NOD-SCID RIP-HuIFN-beta y F1(NOD RIP-HuIFN-beta x C57BL/6J) ha desarrollado DT1 durante el seguimiento hasta las 30 semanas de vida.

La expresión transgénica de IFN-beta por parte de las células beta pancreáticas, implica el desarrollo de DT1 en las cepas resistentes y acelera notablemente la aparición de la enfermedad en las cepas susceptibles. El fondo genético de los animales transgénicos determina el punto de inicio y el porcentaje de individuos que desarrollan DT1. Los animales transgénicos inmunodeficientes no desarrollan la enfermedad. Los animales transgénicos con todos los *loci* del genoma en heterocigosis no desarrollan DT1.

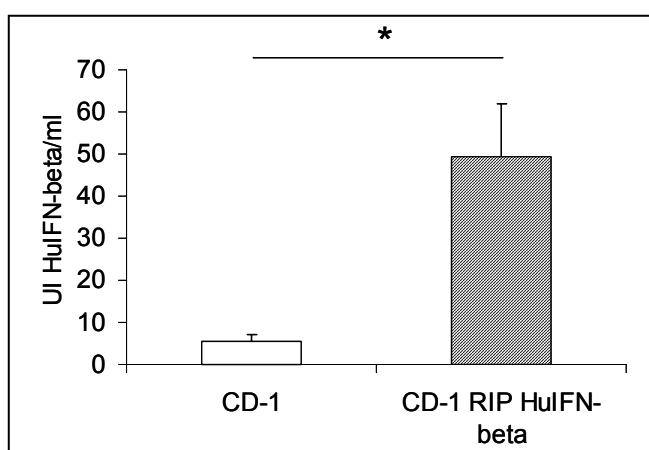


## 2. El transgén y su producto no alteran el metabolismo de la célula beta

Se han realizado diferentes determinaciones metabólicas y se ha generado un modelo inmunodeficiente expresando HuIFN-beta en las células beta pancreáticas, para descartar una posible toxicidad del transgén o su producto.

### 2.1 El HuIFN-beta se detecta en el suero de los animales transgénicos

Para determinar si el producto del transgén tiene distribución exclusivamente local o se distribuye sistémicamente, se ha cuantificado la presencia de IFN-beta humano en suero. Se han analizado los sueros de 7 animales transgénicos CD-1 RIP-HuIFN-beta y los sueros de 5 ratones de la colonia control CD-1. Los animales transgénicos presentan en suero una concentración de la proteína significativamente superior ( $49,24 \pm 12,65$  UI HuIFN-beta/ml) a los controles, que presentan niveles prácticamente indetectables ( $5,55 \pm 1,59$  UI HuIFN-beta/ml), **Figura 19**. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p < 0,01$ ).

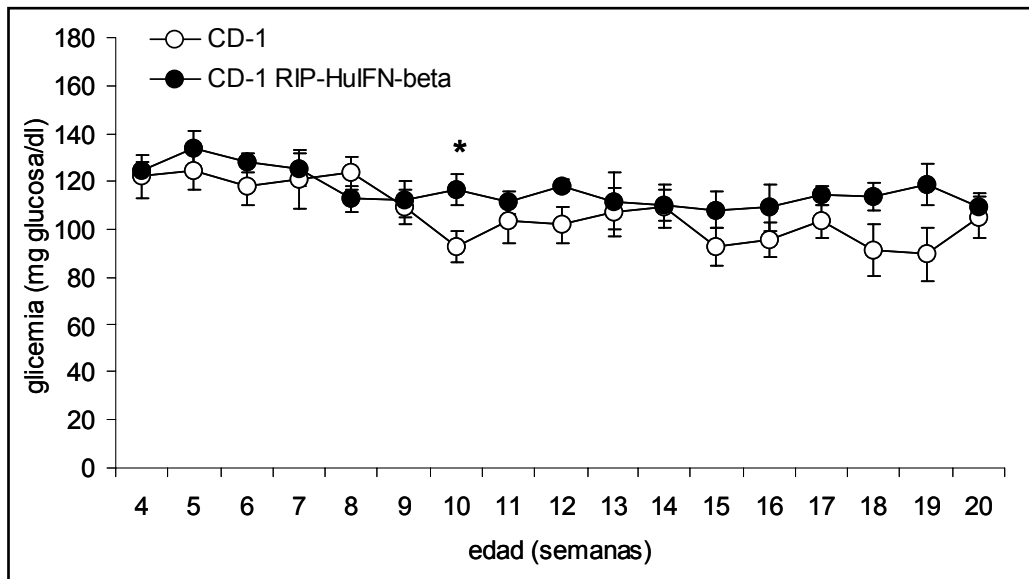


**Figura 19.** Niveles de IFN-beta humano en el suero de individuos CD-1 y CD-1 RIP-HuIFN-beta. Existen diferencias significativas entre ambos grupos \*\* $p < 0,01$ .

### 2.2. La presencia de HuIFN-beta no altera la normoglicemia

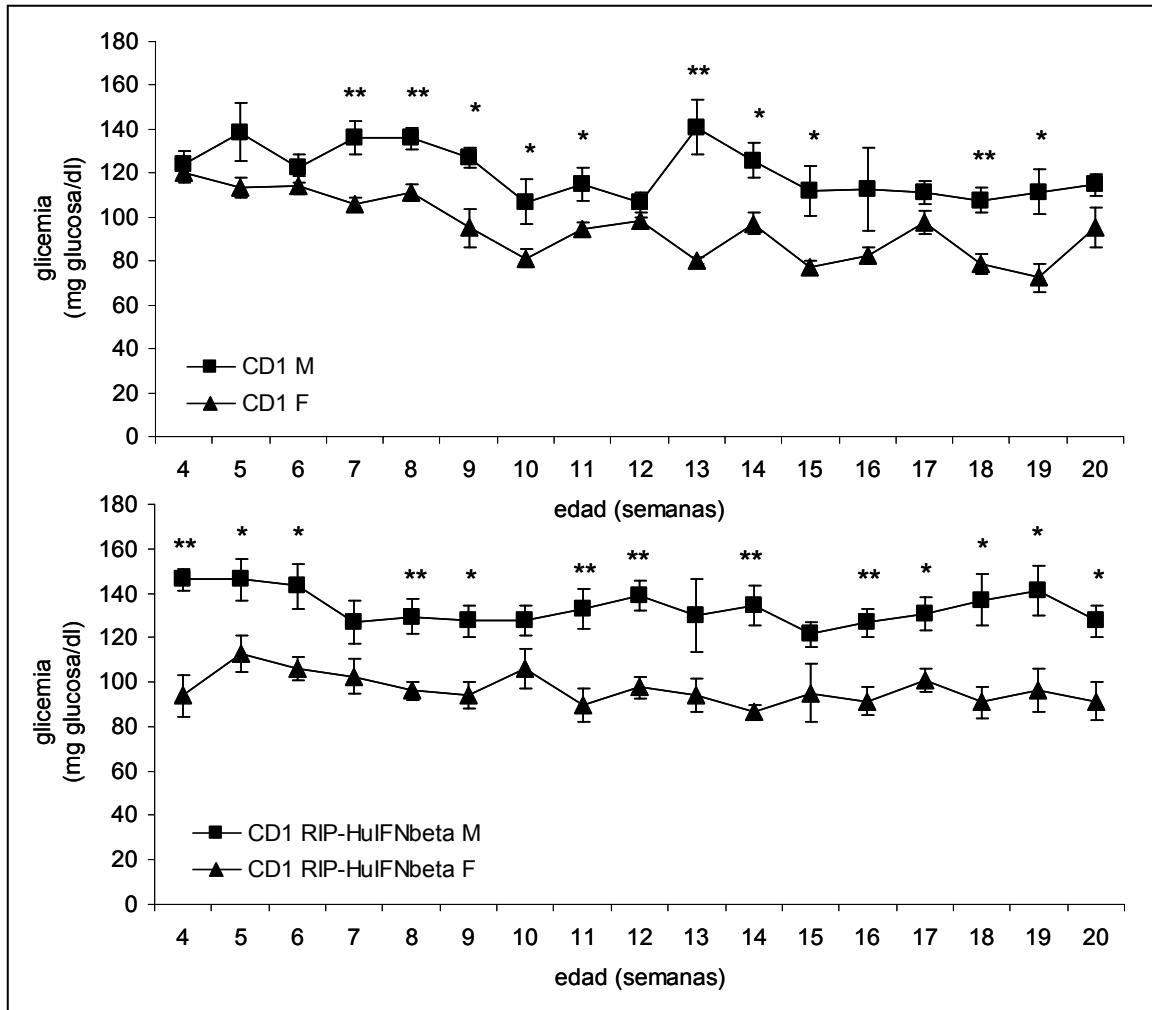
Se ha determinado la glicemia de los animales transgénicos para analizar diferencias en la concentración de la glucosa sanguínea debidas a la expresión del transgén. Este parámetro se ha medido una vez a la semana durante 20 semanas, a partir del destete y con los animales en ayunas, para evitar al máximo diferencias por ingesta de pienso. Los animales que durante el curso del estudio han desarrollado DT1, se han eliminado del mismo. Los animales transgénicos presentan una glicemia ( $116,4 \pm 6,4$  mg glucosa/dl) superior a los controles CD-1 ( $106,7 \pm 8,7$  mg glucosa/dl) y existen diferencias significativas entre ambas colonias aunque ambos grupos se mantienen dentro de la normoglicemia. Al analizar cada edad por separado sólo encontramos diferencias significativas a las 10 semanas aunque ninguno de los dos grupos

presenta un valor fuera de la normalidad (valor normal < 180 mg glucosa/ dl suero), **Figura 20**.



**Figura 20.** Valores de glicemia desde las 4 hasta las 20 semanas de vida en los animales CD-1 y CD-1 RIP-HuIFN-beta. Sólo existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos a las 10 semanas de vida, \* $p < 0,05$

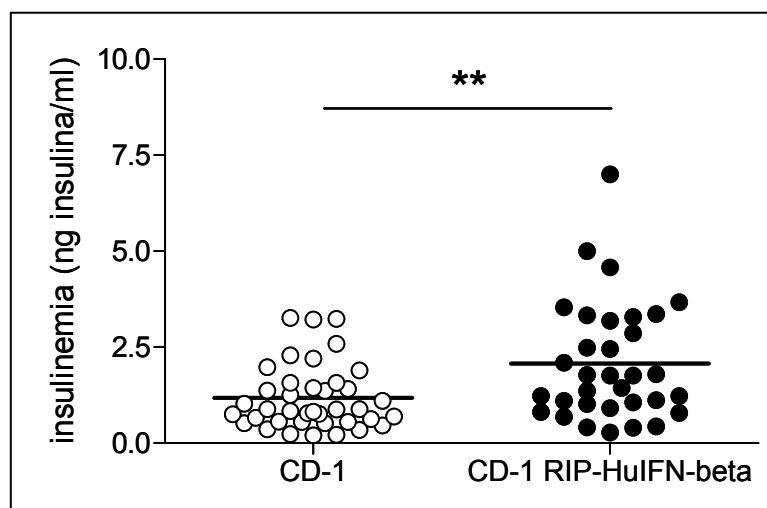
En ambos grupos, las glicemias han sido superiores en los machos que en las hembras y se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos (**Figura 21**). Por tanto, estas diferencias entre sexos no es debido a un efecto directo de la expresión del transgén.



**Figura 21.** La glicemia es superior en los machos de ambas colonias, existiendo diferencias significativas a diferentes edades, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . M=machos y F=hembras.

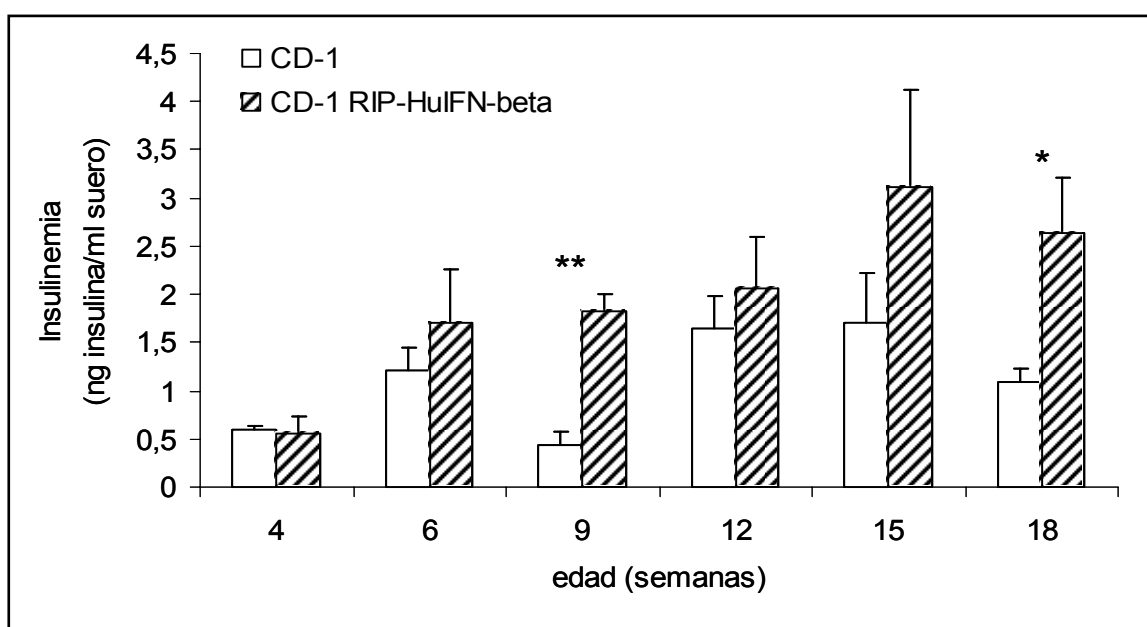
### 2.3 La insulinemia de los animales CD-1 RIP-HuIFN-beta es normal

Se ha cuantificado la concentración de insulina en suero de animales CD-1 RIP-HuIFN-beta y CD-1 mediante RIA para establecer diferencias debidas a la expresión del transgén. Los resultados indican que los animales transgénicos presentan unos niveles séricos de esta hormona normales aunque algo más elevados que sus controles, existiendo diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) globalmente en el grupo de transgénicos ( $2,06 \pm 0,26$  ng insulina/ml suero) respecto a su control ( $1,17 \pm 0,13$  ng insulina/ml suero), **Figura 22.**



**Figura 22.** Concentración de insulina en suero en el grupo de CD-1 y CD-1 RIP-HuIFNbeta. El grupo de animales transgénicos presenta una insulinemia superior al control, \*\* $p < 0,01$ .

Al comparar la insulinemia en función de la edad, se observa que la concentración de insulina en suero se incrementa con la edad. En general los animales CD-1 RIP-HuIFN-beta presentan unas insulinemias superiores a sus controles, pero sólo se observan diferencias estadísticamente significativas a las 9 ( $p < 0,01$ ) y a las 18 semanas ( $p < 0,05$ ) de edad, **Figura 23**.

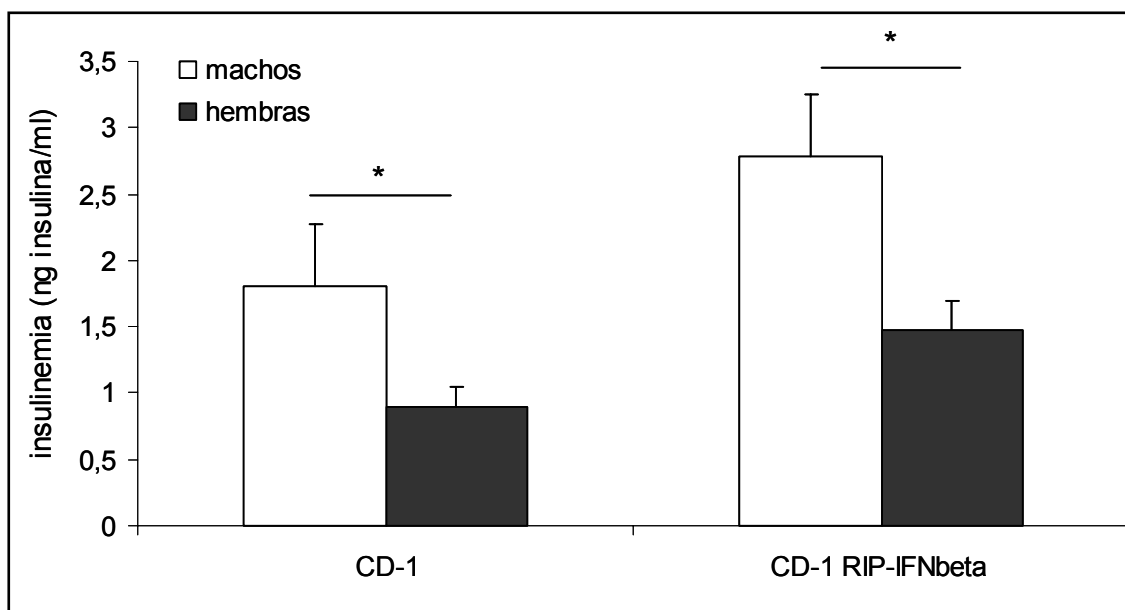


**Figura 23.** Insulinemia a diferentes edades en los grupos CD-1 y CD-1 RIP-HuIFN-beta. Existen diferencias estadísticamente significativas a las 9 y a las 18 semanas de edad, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

También existen diferencias estadísticamente significativas cuando se analizan globalmente machos y hembras de ambos grupos ( $p < 0,05$ ): machos CD-1 ( $1,81 \pm 0,46$ ) vs hembras CD-1 ( $0,89 \pm 0,16$ ) y machos CD-1 RIP-

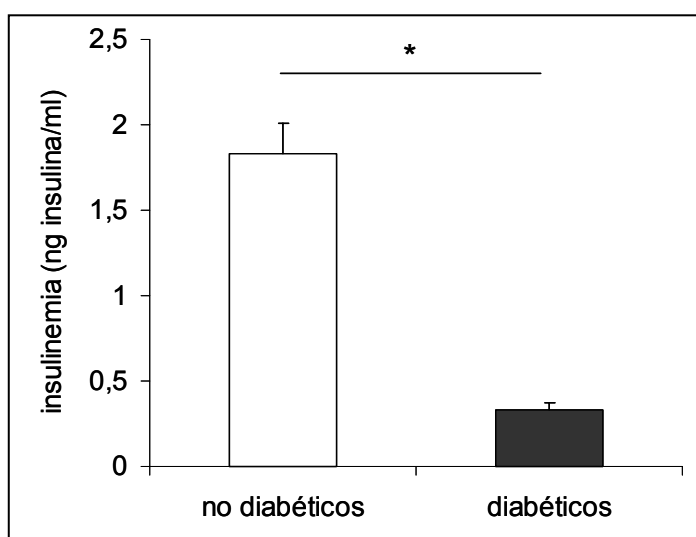


HuIFNbeta ( $2,78 \pm 0,47$ ) vs hembras CD-1 RIP-HuIFN-beta ( $1,48 \pm 0,21$ ), **Figura 24.**



**Figura 24.** Insulinemia de machos y hembras en los grupos CD-1 y CD-1 RIP-HuIFN-beta. Existen diferencias en la concentración de insulina en suero entre machos y hembras de ambos grupos, \* $p < 0.05$ .

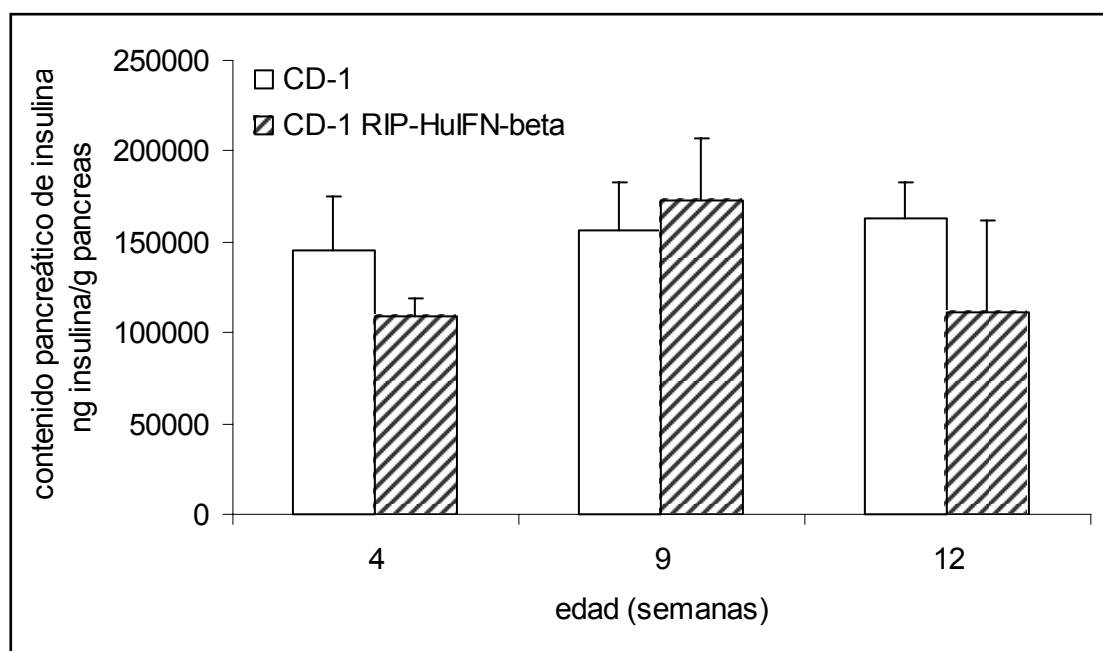
Como es de esperar, los animales diabéticos de la colonia CD-1 RIP-IFN-beta presentan una insulinemia mucho menor ( $0,3 \pm 0,04$ ) que los sanos a las 9 semanas ( $1,83 \pm 0,18$ ), existiendo diferencias significativas entre ambos grupos ( $p < 0,05$ ), **Figura 25.**



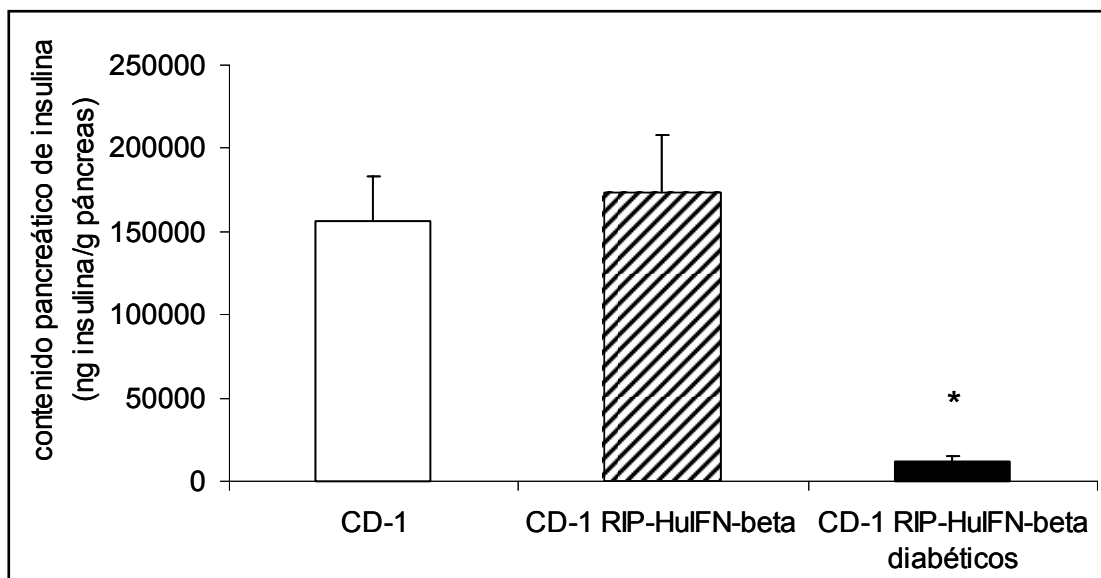
**Figura 25.** Insulinemia en el grupo de animales sanos a las nueve semanas de edad y diabéticos de la cepa *outbred* CD-1 RIP-HuIFN-beta. Existen diferencias significativas entre ambos grupos, \* $p < 0.05$ .

#### 2.4 El contenido pancreático de insulina no se encuentra alterado en los animales transgénicos

Para determinar la concentración de insulina en los páncreas de los dos grupos de animales de estudio y determinar diferencias debidas a la expresión del transgén, se realizó un RIA de homogenizados de páncreas. Los resultados expresados en ng de insulina/g de páncreas, no muestran diferencias significativas entre grupos de animales sanos a diferentes edades (**Figura 26**). Como es lógico, sí existen diferencias ( $p < 0,05$ ) entre animales diabéticos ( $12192,12 \pm 2407,82$ ) y no diabéticos: CD-1 ( $156571,87 \pm 26691,07$ ) y CD-1 RIP-HuIFN-beta ( $172967,32 \pm 34482,9$ ), **Figura 27**.



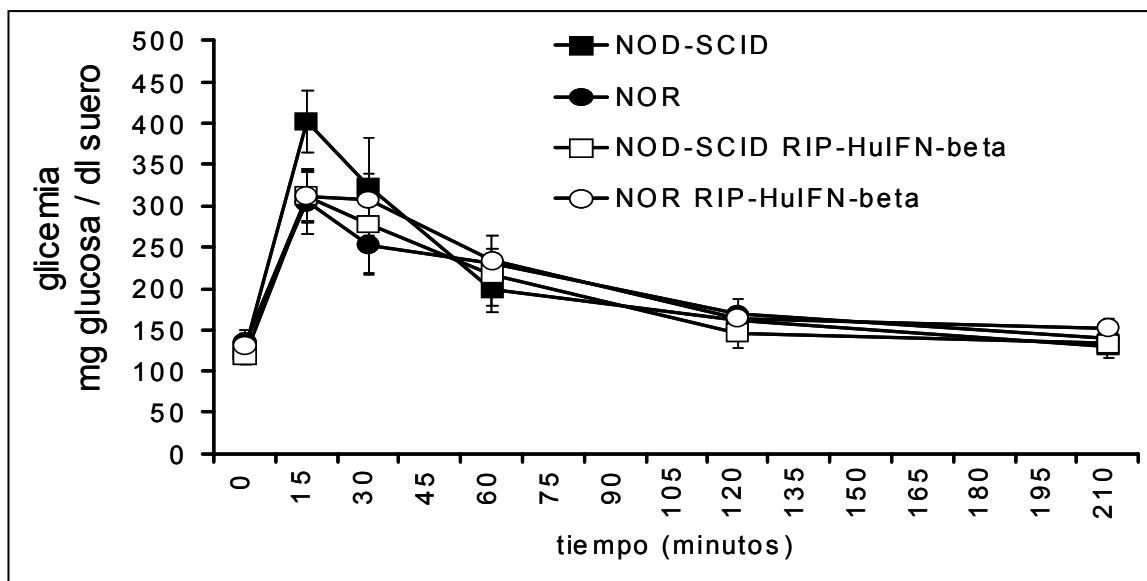
**Figura 26.** Contenido de insulina pancreático a diferentes edades en animales CD-1 RIP-HuIFN-beta respecto a sus controles. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos



**Figura 27.** Contenido de insulina pancreático en animales sanos y diabéticos. Existen diferencias entre el contenido pancreático de insulina de los animales diabéticos y animales sanos de nueve semanas de edad de ambos grupos, \* $p < 0,05$ .

### ***2.5 La respuesta insulínica a la glucosa es normal en los animales transgénicos***

Para determinar si el transgén podría estar influenciando el metabolismo de la célula beta, se analizó la respuesta insulínica a un aumento agudo de la glicemia en sangre de animales NOD-SCID RIP-HuIFN-beta y NOR RIP-HuIFN-beta y sus respectivos controles (NOD-SCID y NOR). Los cuatro grupos de animales alcanzaron el valor más alto de glucosa en sangre 15 minutos después de la administración intraperitoneal de 2 mg de glucosa por g de peso vivo y todos recuperaron los valores basales en los 120 minutos de seguimiento (**Figura 28**). No se han encontrado diferencias significativas entre los diferentes grupos, demostrando que el transgén no afecta la producción y secreción de insulina por parte de las células beta pancreáticas frente a un estímulo de glucosa.

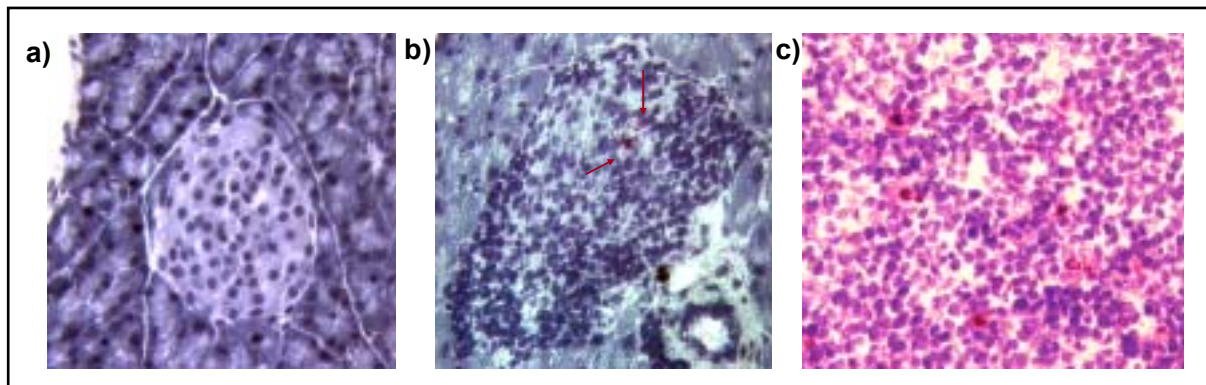


**Figura 28.** Test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa en NOD-SCID, NOR, NOD-SCID RIP-HuIFN-beta, NOR RIP-HuIFN-beta. No existen diferencias entre individuos transgénicos y controles, tras la administración de glucosa en condiciones de ayuno, la glicemia alcanza niveles basales a los 120 minutos en todos los grupos.

## 2.6 El producto del transgén no causa apoptosis en los islotes

Para detectar una posible muerte celular por apoptosis debida a la expresión de la citocina IFN-beta en los islotes, se empleó la técnica TUNEL y posterior análisis de las células apoptóticas. En las muestras de páncreas de CD-1 no se observó ninguna célula apoptótica, ni en tejido endocrino ni en exocrino. En los animales transgénicos sanos tampoco se detectaron células apoptóticas en los islotes (**Figura 29**) aunque en el páncreas de 4 sujetos se han observado algunas células de tejido exocrino positivas para la tinción, no más de 2 por sección.

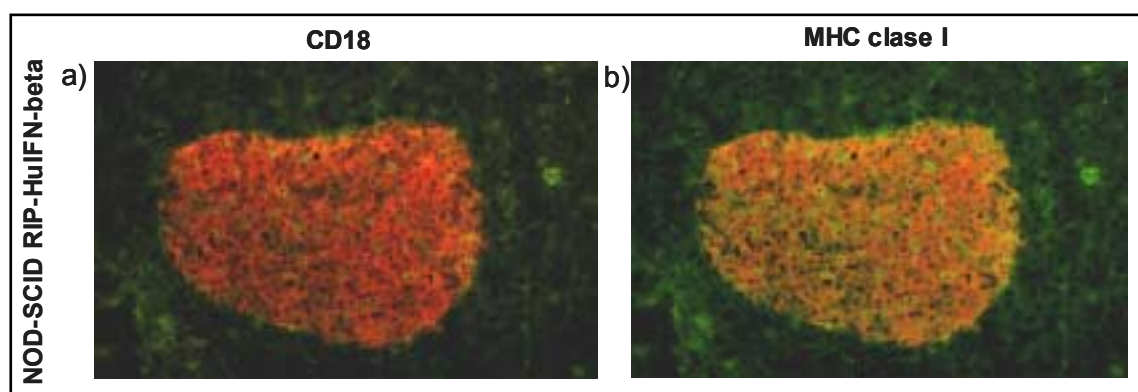
Como era de esperar, al analizar los páncreas de algunos animales diabéticos, la proporción de células apoptóticas exocrinas aumenta (entre 2 y 24 células por sección) y se detecta ocasionalmente alguna célula apoptótica dentro de islotes muy infiltrados. En el control positivo (timo) se observan claramente células apoptóticas marcadas en rojo. Paralelamente y como control adicional, se observaron células apoptóticas en los islotes de un ratón NOD en fase de destrucción, fenómeno ya descrito previamente (**Figura 29**)



**Figura 29.** a) Islote de un ratón CD-1 RIP-IFN-beta, no se observan células apoptóticas. b) Células apoptóticas en el islote de una hembra NOD de 12 semanas (flechas). c) Control positivo, células apoptóticas en el timo de una animal de 6 semanas.

### 2.7 El modelo NOD-SCID RIP-HuIFNbeta no desarrolla insulinitis ni diabetes

Para descartar el efecto tóxico del transgén y demostrar que la diabetes de este modelo experimental es linfocito-dependiente, se generó la cepa NOD-SCID RIP-HuIFN-beta mediante retrocruzamientos selectivos de la cepa transgénica NOD RIP-HuIFNbeta con el modelo inmunodeficiente NOD-SCID. Ninguno de los individuos de esta cepa transgénica ha desarrollado ni insulinitis ni diabetes. Los islotes de estos animales muestran una marcada expresión de MHC de clase I a causa de la producción de IFN-beta por parte de las células beta pancreáticas.



**Figura 30.** Doble inmunofluorescencia indirecta sobre islotes de NOD-SCID RIP-HuIFN-beta. En rojo se muestra la tinción para insulina. a) En verde, tinción con el anticuerpo panleucocitario CD18 y b) En verde, tinción contra MHC de clase I.

### 3. Inmunohistología

#### 3.1 Determinación del grado de insulitis

Se ha analizado el grado de infiltración de los islotes de todas las cepas de estudio para determinar si la expresión del transgén provoca cambios en el grado de infiltración. Se han analizado más de 300 islotes por grupo con una media de 40 islotes por animal (**Tabla 32**).

**Tabla 32.** Número de islotes analizados de cada uno de los grupos de estudio.

Grupo	CD-1	CD-1 Tg	NOR	NOR Tg	NOD	NOD Tg
<b>Islotes analizados</b>	580	882	324	447	946	724

Los resultados indican que (**Tabla 33**):

- El grupo de animales CD-1 RIP-HuIFN-beta aumenta el número de islotes infiltrados con la edad, aunque el porcentaje final no es muy elevado (28%). En los animales control CD-1, el número de islotes infiltrados a las 6 semanas es aproximadamente de un 20% y este número disminuye hasta la mitad con la edad.
- El porcentaje de islotes infiltrados en la cepa NOR RIP-HuIFN-beta es muy elevado desde edades tempranas (6 semanas) y este porcentaje se mantiene con la edad (un 86% de los islotes infiltrados). La cepa control NOR presenta un bajo porcentaje de infiltración (6%) que a las doce semanas llega hasta un 23% de los islotes infiltrados.
- La cepa NOD transgénica presenta un porcentaje muy elevado de islotes infiltrados desde edades muy tempranas (6 semanas) y este porcentaje se mantiene con la edad de animal (un 88% de los islotes afectados de media). La cepa NOD aumenta de forma progresiva el porcentaje de islotes infiltrados con la edad, pasando de un 23% a las 6 semanas a un 56% de los islotes infiltrados a las 12 semanas de edad.

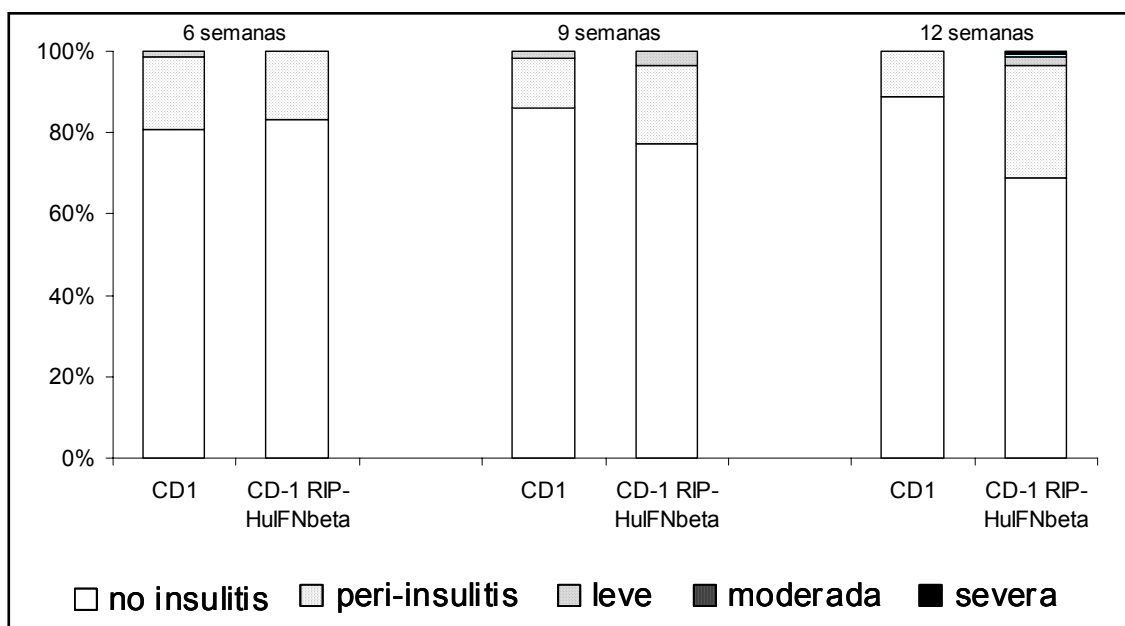
**Tabla 33.** Porcentaje de islotes infiltrados a diferentes edades en los distintos grupos de estudio.

grupo edad (semanas)	CD-1	CD-1 Tg	NOR	NOR Tg	NOD	NOD Tg
<b>6</b>	19,45	17,67	6,06	91,52	22,72	83,45
<b>9</b>	13,22	27,51	3,60	81,62	42,60	91,76
<b>12</b>	10,72	28,07	23,23	86,80	55,96	90,86

La expresión de HulFN-beta acelera el proceso de infiltración e incrementa de forma considerable el porcentaje de islotes infiltrados en los animales en fondo genético NOR y NOD.

### 3.1.1 Distribución del infiltrado en fondo genético CD-1

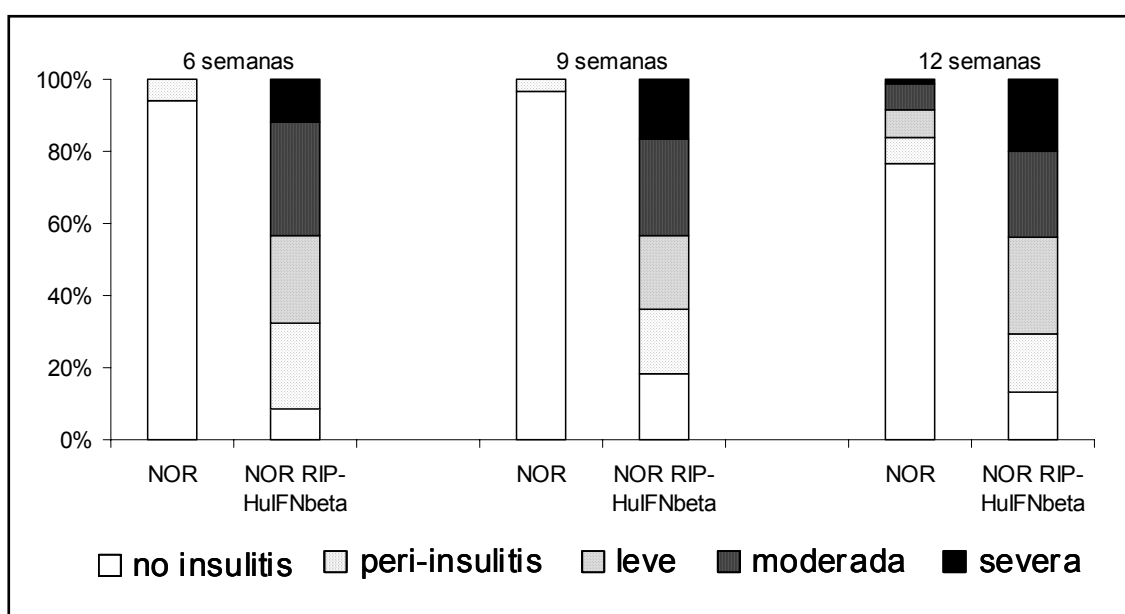
Al analizar la distribución de las diferentes categorías de infiltrado en los islotes, se observa que la infiltración predominante en los grupos de CD-1 y CD-1 transgénicos es en forma de periinsulitis independientemente de la edad (**Figura 31**). La expresión de HulFN-beta aumenta de forma muy discreta el número de islotes con infiltración moderada o severa a partir de las 12 semanas de edad.



**Figura 31.** Infiltración de los islotes a diferentes edades en los grupos de CD-1 y CD-1 RIP-HulFN-beta.

### 3.1.2 Distribución del infiltrado en fondo genético NOR

Los ratones NOR RIP-HuIFNbeta muestran ya una elevada infiltración a edades tempranas que se mantiene con la edad. En los islotes de estos animales se observan todas las categorías de insulitis y con el tiempo, los grados más leves disminuyen el porcentaje ligeramente en favor de las formas de insulitis más agresivas (moderada y severa). En los animales NOR prácticamente no hay infiltrado o aparece en forma de periinsulitis en un porcentaje bajo de islotes que a las 12 semanas aumenta hasta un 23% y presenta formas más severas de infiltración (**Figura 32**).

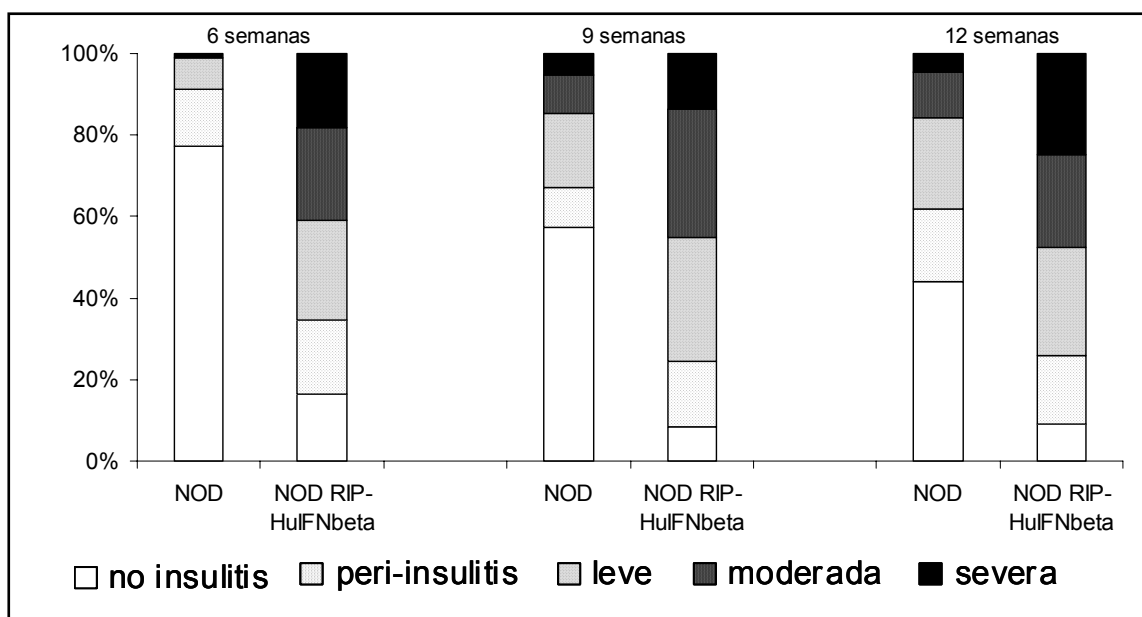


**Figura 32.** Infiltración de los islotes a diferentes edades en las cepas *inbred* NOR y NOR RIP-HuIFN-beta.

### 3.1.3 Distribución del infiltrado en fondo genético NOD

En la cepa NOD RIP-HuIFN-beta se observa la misma evolución del infiltrado que en los ratones NOR transgénicos, presentan una elevada infiltración a edades tempranas que se mantiene con la edad. Se observan todas las categorías de insulitis en los islotes y con la edad, los grados más leves disminuyen el porcentaje de forma discreta en favor de las formas de insulitis más agresivas (moderada y severa). Los animales NOD, como es característico de la cepa, aumentan el infiltrado en los islotes con la edad, tanto en porcentaje como en la severidad del infiltrado (**Figura 33**).





**Figura 33.** Infiltración de los islotes a diferentes edades en las cepas *inbred* NOD y NOD RIP-HuIFN-beta.

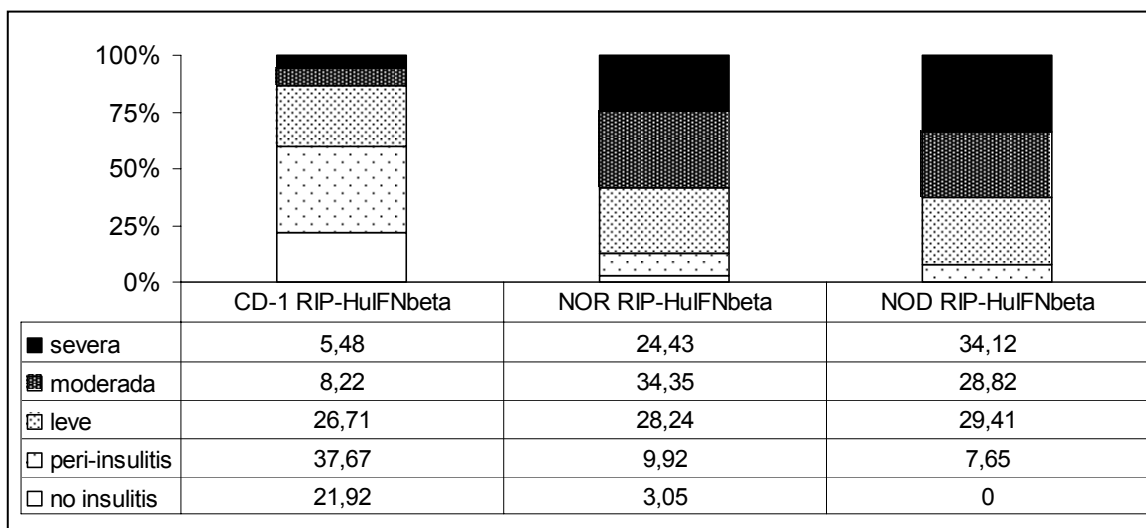
### 3.1.4 Influencia del fondo genético en la insulitis causada por IFN-beta

Al analizar los grados de infiltración de los diferentes grupos a las doce semanas, que es en general cuando encontramos el mayor porcentaje de islotes infiltrados, se observa que (**Figura 34**):

- En el grupo CD-1, la expresión de IFN-beta aumenta el porcentaje de los islotes infiltrados de un 11% en los animales no transgénicos a un 40% en los transgénicos, aunque no la severidad de la infiltración. Del total de islotes infiltrados, el 87,5% presenta una infiltración en forma de peri-insulitis y el resto formas más severas.
- La expresión de HuIFN-beta en la cepa NOR implica que los animales pasen de una situación del 77% de los islotes libres de insulitis, a tener el 87% de los islotes infiltrados, la mayoría de ellos con los tipos de infiltración más agresivos
- Los animales NOD, que a esta edad se encuentran en fase prediabética, presentan más de la mitad de los islotes infiltrados. La expresión de IFN-beta influencia tanto el incremento del porcentaje de islotes infiltrados (91% de los islotes con insulitis), como la agresividad de la infiltración ya que la mitad de los islotes presentan insulitis moderada o severa.



- En los animales NOD RIP-HuIFN-beta diabéticos no se han observado islotes normales y un gran porcentaje de ellos presentan insulinitis severa (el 34% del total).



**Figura 35.** Grados de infiltración en los animales diabéticos de los grupos CD-1 RIP-HuIFN-beta, NOR RIP-HuIFN-beta y NOD RIP-HuIFN-beta.

Al determinar en cada cepa, a diferentes edades, el índice de infiltración denominado *insulitis score* (ver Material y Métodos, 4.1 Determinación del grado de insulitis), se observa que (Figura 36):

- Los animales de la colonia CD-1 tanto transgénicos como controles, están muy poco infiltrados. Los animales CD-1 transgénicos muestran una *insulitis score* de  $0,17 \pm 0,03$  a las 6 semanas que pasa a  $0,32 \pm 0,07$  a las 12 semanas de vida, mientras que el índice de los CD-1 baja de un  $0,21 \pm 0,02$  a las 6 semanas a un  $0,10 \pm 0,04$  a las 12 semanas de vida. Ambos grupos sólo muestran diferencias significativas a las 12 semanas de edad ( $p < 0,05$ ).
- Los ratones transgénicos en fondo genético NOR presentan una elevado índice de infiltración desde las 6 semanas de vida ( $2,23 \pm 0,25$ ), que se mantiene con la edad ( $2,31 \pm 0,17$ ). En los animales de la cepa NOR no se observa prácticamente infiltrado a nivel insular siendo la *insulitis score* a las 12 semanas de  $0,47 \pm 0,17$ .
- Al analizar los animales en *background* NOD, se observa que los ratones transgénicos presentan el índice de infiltración muy elevado desde edades

muy tempranas ( $2,05 \pm 0,22$ ) y se incrementa muy poco con la edad ( $2,42 \pm 0,13$ ), mientras que los animales de la cepa original NOD incrementan la infiltración con la edad, pasando de un  $0,31 \pm 0,09$  a las 6 semanas de vida a un  $1,15 \pm 0,12$  a las 12 semanas.

Cuando comparamos la *insulitis score* de los diferentes grupos de animales diabéticos, se observa que mientras que los transgénicos en fondo NOR y NOD presentan un índice muy similar ( $2,75 \pm 0,57$  NOR RIP-HuIFN-beta vs  $2,98 \pm 0,56$  NOD RIP-HuIFN-beta) sin diferencias entre ambos grupos, los animales diabéticos del grupo CD-1 RIP-HuIFN-beta muestran un valor significativamente inferior ( $p < 0,01$ ) a los otros dos grupos,  $1,36 \pm 0,43$  (Figura 36).

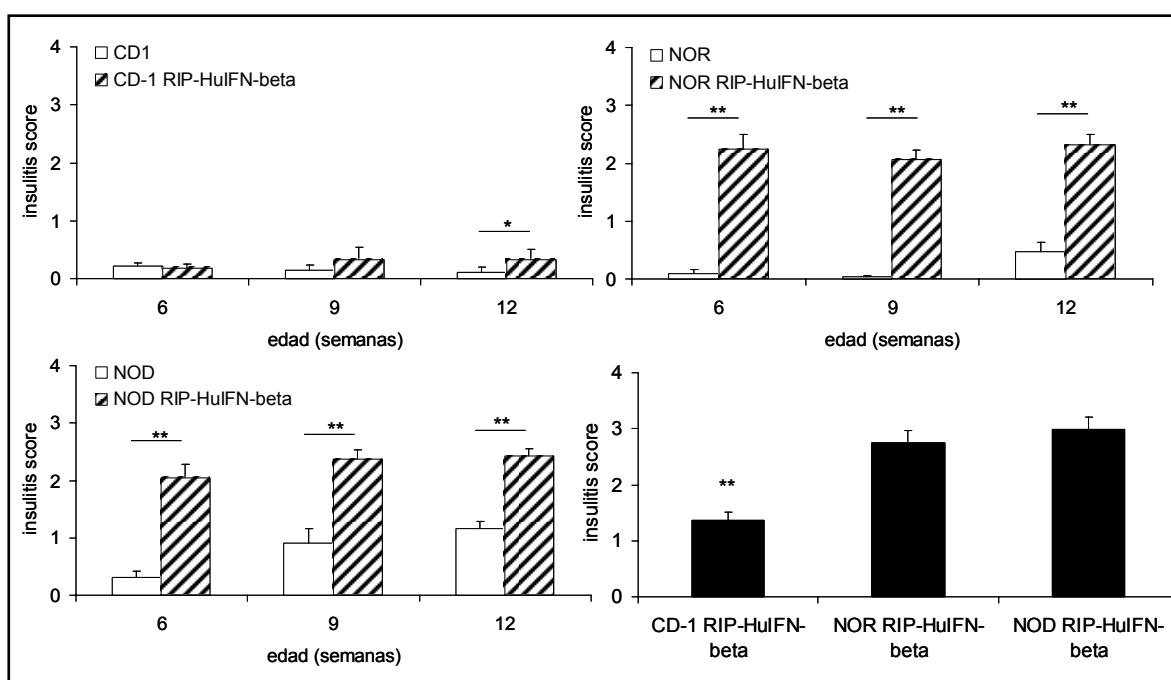
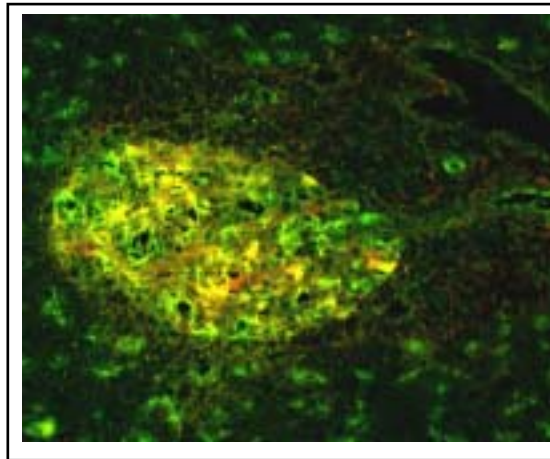


Figura 36. *Insulitis score* en los diferentes grupos de estudio, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

### 3.2 Inmunohistología de los islotes. Caracterización del infiltrado.

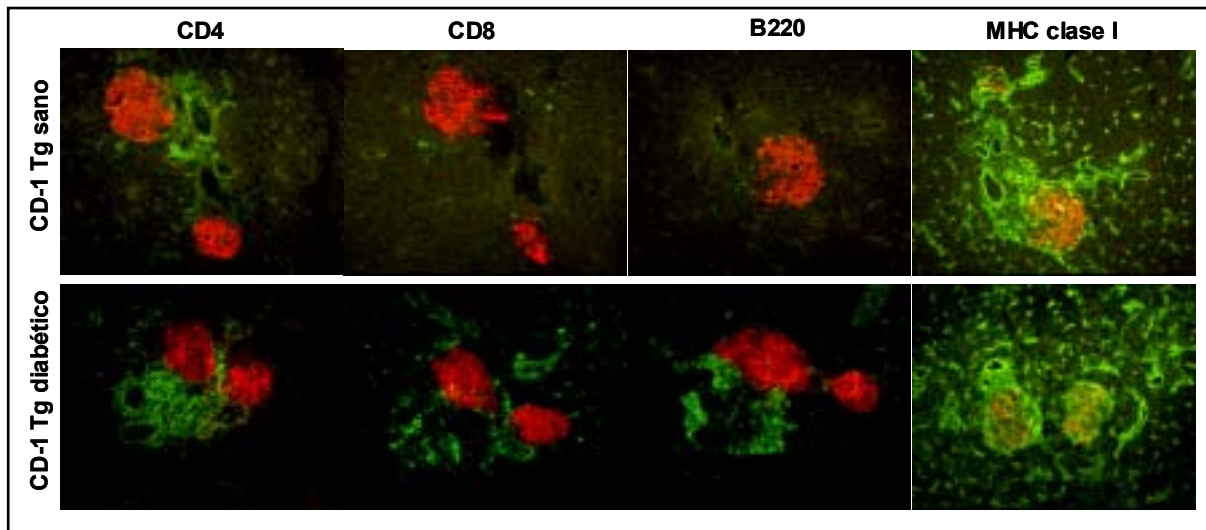
Mediante inmunofluorescencia indirecta se han caracterizado los tipos celulares que forman el infiltrado pancreático y cómo se distribuyen en la lesión en los diferentes grupos de estudio.

- Como confirmación de la expresión del transgén, HuIFN-beta se detecta en los islotes de los animales transgénicos en todos los fondos genéticos y colocaliza con la tinción para insulina (Figura 37).



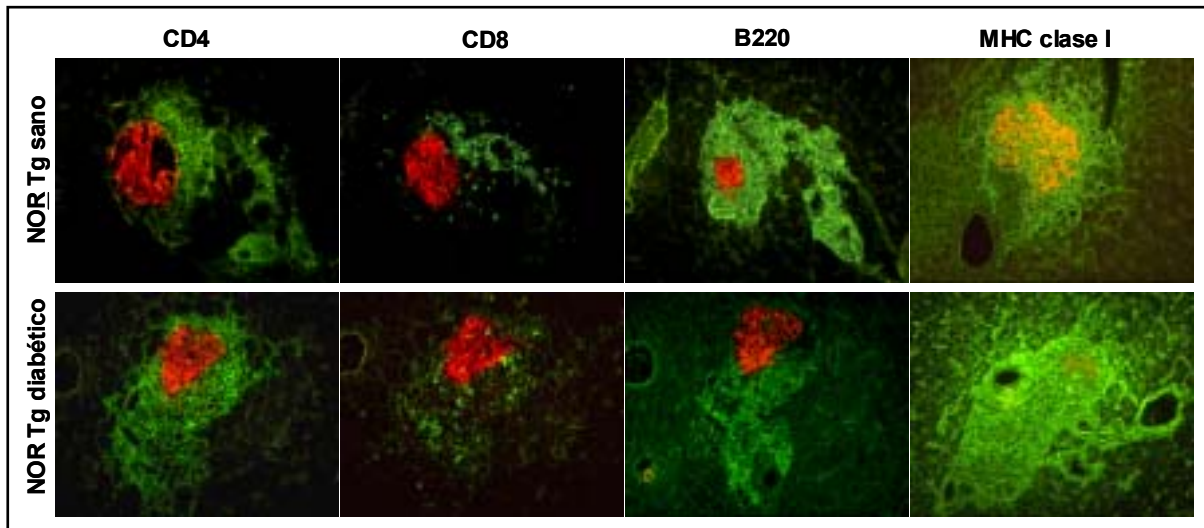
**Figura 37.** Doble inmunofluorescencia indirecta de criosecciones de páncreas de un animal transgénico, en rojo se muestra la tinción para insulina y en verde la tinción específica para HuIFN-beta.

- Los islotes de los ratones sanos del grupo CD-1 RIP-HuIFN-beta, están predominantemente no infiltrados (75%) y dentro del grupo de infiltrados, la mayoría presenta una infiltración en forma de peri-insulitis. La caracterización fenotípica de la insulitis muestra que la mayoría de células mononucleares infiltrantes son linfocitos T (CD4>CD8). Las células B se detectaron sólo ocasionalmente. Del grupo de APCs, se detectaron algunos macrófagos alrededor del tejido endocrino y se ha observado alguna célula dendrítica ocasionalmente en islotes no infiltrados o poco infiltrados. La molécula de MHC de clase I se hiperexpresa en las células endocrinas de todos los islotes, pero no así MHC de clase II. El grupo de animales diabéticos presenta un grado de infiltración mayor que el grupo de animales sanos CD-1 RIP-HuIFN-beta, siendo la composición del infiltrado similar excepto por la presencia de grupos de células B en la periferia de los islotes (**Figura 38**).



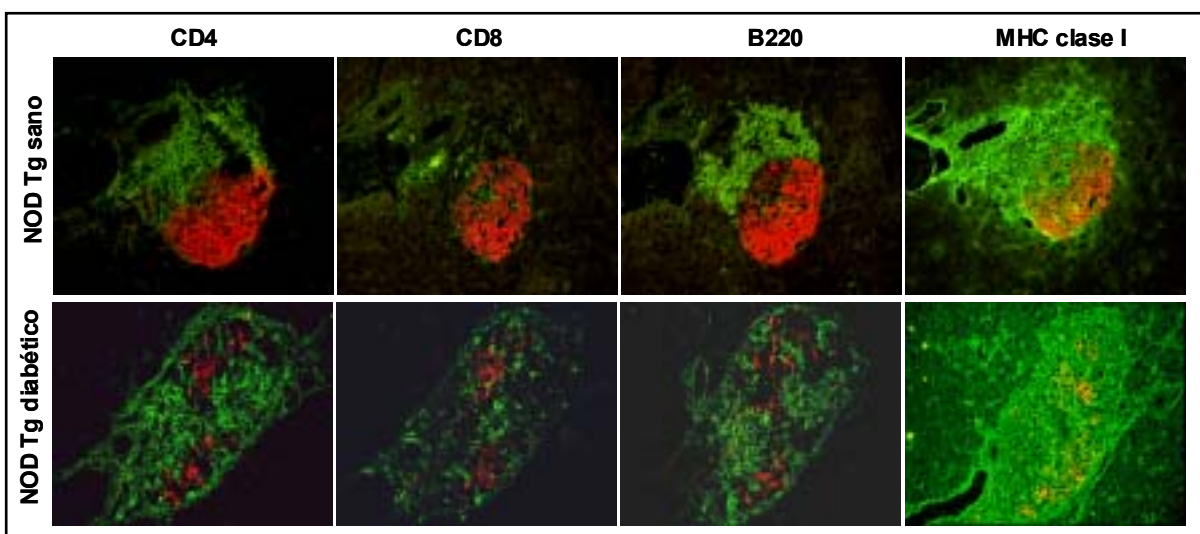
**Figura 38.** Doble inmunofluorescencia indirecta de criosecciones de páncreas de CD-1 RIP-HuIFN-beta sano y diabético. En rojo se observa la tinción de insulina y en verde los marcadores específicos de linfocitos CD4 y CD8, linfocitos B y MHC de clase I.

- El 86% de islotes de los animales sanos NOR RIP-HuIFN-beta presentan infiltración. La caracterización de este infiltrado muestra principalmente linfocitos B y T (CD4>CD8) y algunas células NK. Las células B y CD4+ se distribuyen en forma de grupos alrededor de los islotes, pero no las CD8+ y NK que se observan aisladas en el tejido exocrino, en el grueso del infiltrado y en el tejido endocrino que aún no ha sido destruido. Se observan algunos macrófagos en la periferia o dentro de los islotes. En los islotes infiltrados no se detectan apenas células dendríticas, cuando se observan ocasionalmente, se localizan preferentemente en el tejido endocrino. Los islotes de estos animales hiperexpresan MHC de clase I en endocrino e infiltrado pero no MHC de clase II que sólo se expresa en células identificadas como APCs. Los islotes de los animales diabéticos NOR RIP-HuIFN-beta presentan una disminución acentuada de la masa celular beta. La composición del infiltrado es similar excepto por una intensidad superior a la de los animales sanos (**Figura 39**).



**Figura 39.** Doble inmunofluorescencia indirecta de criosecciones de páncreas de NOR RIP-HuIFN-beta sano y diabético. En rojo se observa la tinción de insulina y en verde los marcadores específicos de linfocitos CD4 y CD8, linfocitos B y MHC de clase I.

- Los animales NOD RIP-HuIFN-beta presentan el mismo patrón en la composición del infiltrado que los NOR RIP-HuIFN-beta, tanto sanos como diabéticos (**Figura 40**). La insulinitis está formada principalmente por linfocitos CD4 y células B que se distribuyen grupos. Los linfocitos CD8 se localizan aisladamente en el infiltrado y en el interior de los islotes. Los macrófagos se localizan principalmente alrededor del infiltrado y las células dendríticas se localizan ocasionalmente en el tejido endocrino y en el infiltrado. Ambos tipos de APCs expresan MHC de clase II pero no el tejido endocrino. El tejido endocrino expresa de forma marcada MHC de clase I.



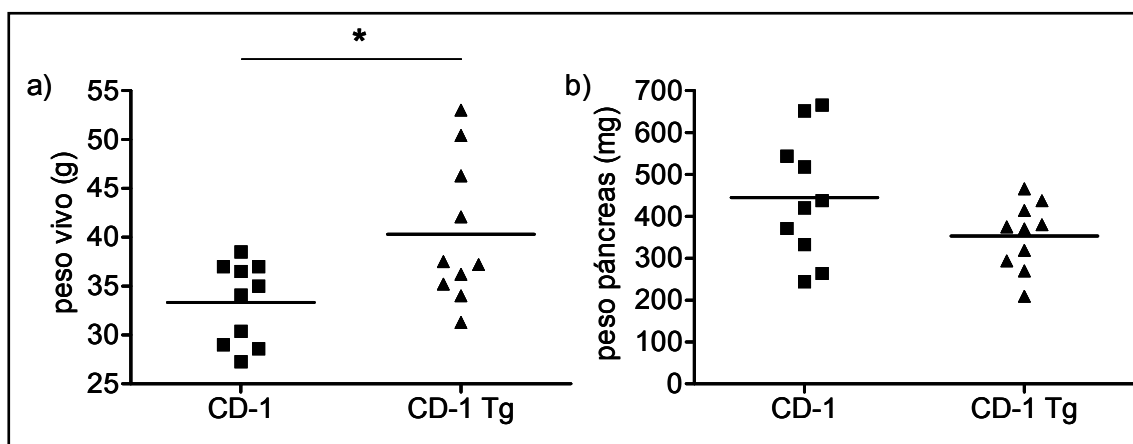
**Figura 40.** Doble inmunofluorescencia indirecta de criosecciones de páncreas de NOD RIP-HuIFN-beta sano y diabético. En rojo se observa la tinción de insulina y en verde los marcadores específicos de linfocitos CD4 y CD8, linfocitos B y MHC de clase I.

- El estudio de los páncreas de animales NOD-SCID RIP-HuIFN-beta muestra la ausencia de infiltrado en los islotes de estos animales tras tinción con un anticuerpo panleucocitario, aunque puede observarse alguna célula *passenger*. Los islotes de estos animales expresan MHC de clase I en el islote debido a la expresión de HuIFN-beta por parte de las células productoras de insulina (**Figura 30**).

## 4. Estudios morfológicos

### 4.1 La expresión del transgén no afecta a la masa pancreática

Se ha determinado el peso vivo y el peso del páncreas de los animales transgénicos y sus controles para establecer una correlación entre ambos valores. El peso vivo medio de los animales transgénicos es superior al de los animales CD-1 ( $p < 0,05$ ), pero no existen diferencias significativas entre el peso de los páncreas del modelo transgénico y su control (**Figura 41**).

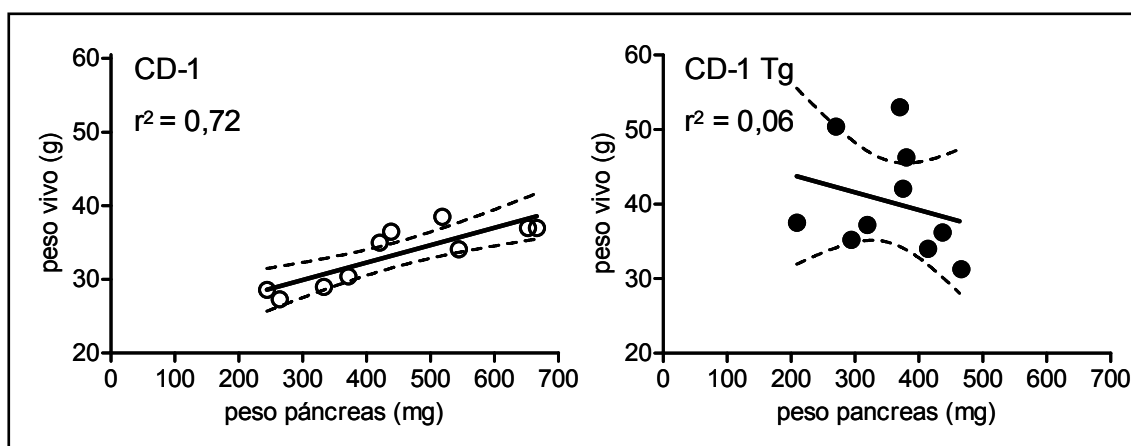


**Figura 41.** a) Peso vivo (g) de animales CD-1 y CD-1 RIP-HuIFN-beta de 12 semanas de edad, b) Peso del páncreas (mg) de animales CD-1 y CD-1 Tg de 12 semanas de edad, \*  $p < 0,05$ .

La ratio peso páncreas (mg)/peso animal (g) muestra diferencias estadísticamente significativas entre animales transgénicos y sus controles ( $p < 0,05$ ), **Tabla 34**.

Mientras que el grupo de CD-1 muestra una correlación positiva entre el peso vivo del animal y el peso del páncreas, en los animales transgénicos esta correlación no existe (**Figura 42**).





**Figura 42.** Correlación entre el peso vivo del animal y el peso del páncreas en los animales CD-1 y CD-1 RIP-HuIFN-beta.

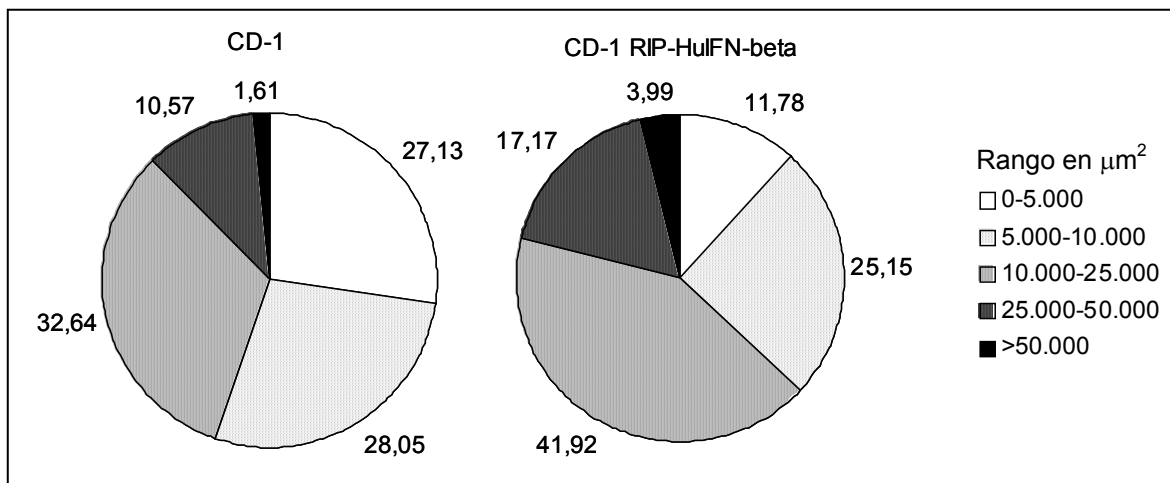
**Tabla 34.** Medias  $\pm$  error estándar del peso vivo, peso del páncreas y ratio peso del páncreas/peso vivo en los animales CD-1 y CD-1 RIP-HuIFN-beta.

Grupo	Peso vivo (g)	Peso del páncreas (mg)	Peso páncreas/peso vivo (mg páncreas/g peso vivo)
CD-1	33,34 $\pm$ 1,30	445 mg $\pm$ 46,98	13,09 $\pm$ 1,00
CD-1 Tg	40,32 $\pm$ 2,31	353,4 mg $\pm$ 25,23	9,10 $\pm$ 0,96 (*)

#### 4.2 Aumento del área de los islotes de los animales transgénicos

Durante los estudios dirigidos a la caracterización de la inmunología de la diabetes en este modelo, se ha observado un mayor tamaño de los islotes de los animales transgénicos respecto a los controles. Para confirmar la observación se ha determinado el área de los islotes de animales CD-1 control y transgénicos (media de 43 islotes / animal). El área media indica un tamaño de los islotes un 25% mayor en los animales transgénicos y este dato se confirma estadísticamente ( $p < 0,01$ ), **Tabla 35**. En el grupo de los animales transgénicos se observan ocasionalmente algunos islotes de tamaño excepcionalmente grande que se describen en la literatura como mega-islotes<sup>380</sup>.

Al analizar los islotes por rango de tamaño, se observa que el porcentaje de islotes de mayor tamaño es superior en el grupo de animales transgénicos (**Figura 43**).



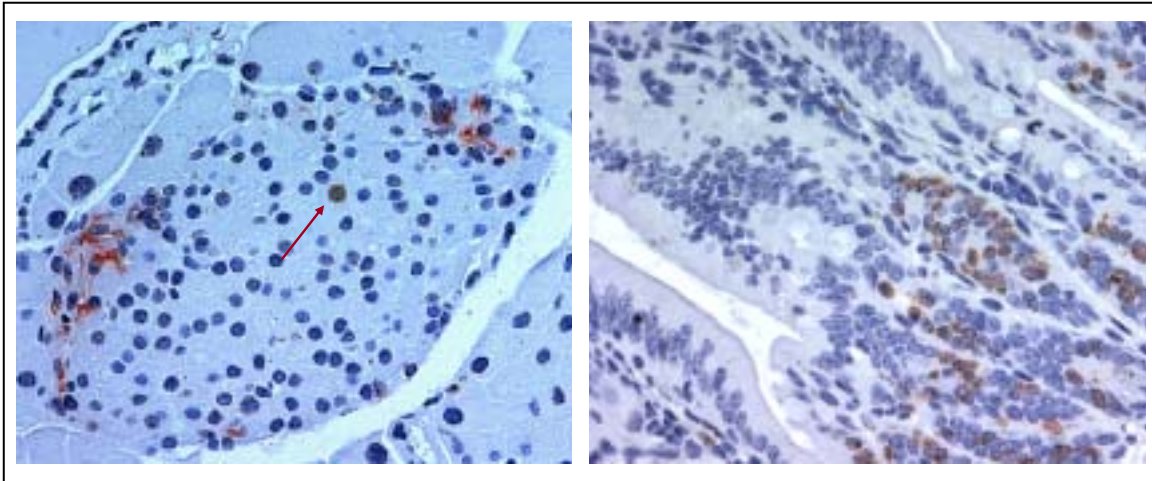
**Figura 43.** Distribución de los islotes por rango de tamaño en los grupos CD-1 y CD-1 RIP-HuIFN-beta.

#### **4.3 Los animales transgénicos presentan células beta de tamaño normal**

Para determinar la causa del mayor tamaño de los islotes de los animales transgénicos, se han medido las áreas de los islotes y contado las células beta de los mismos. Se ha calculado el área promedio (ratio) de las células beta mediante el cociente entre el área celular beta (valor relativo a la imagen obtenida en el microscopio confocal) y el número de núcleos. No hay diferencias significativas entre el área de las células beta del modelo transgénico ( $431 \pm 16,10 \mu\text{m}^2$ ) respecto a su control ( $407 \pm 15,73 \mu\text{m}^2$ ).

#### **4.4 Los animales transgénicos no presentan alteraciones en el grado de proliferación de las células beta**

Una vez determinado que el tamaño de los islotes transgénicos realmente es mayor y descartado que el tamaño superior del área de las células beta sea la causa del mayor tamaño del islote, se ha determinado el grado de proliferación de las células beta, para evaluar una posible hiperplasia activa en sujetos adultos como causa del mayor tamaño de los islotes. Se entiende el grado de proliferación como el número de células beta en división por cada 10000 células beta: en CD-1, el grado de proliferación es de 21 mientras que en el modelo transgénico es de 15, por tanto estos resultados preliminares indican que el grado de proliferación es ligeramente mayor en las células beta de los animales control aunque no existen diferencias estadísticamente significativas (**Figura 44**).



**Figura 44.** a) célula BrdU positiva en un islote de un ratón CD-1. b) tinción de BrdU en una sección de intestino, control positivo.

#### **4.5 La densidad celular de los islotes es igual en animales transgénicos y controles**

Se ha determinado si el número relativo de células por islote es mayor en un grupo que en otro, para ello se ha contado el número de células respecto al área (valor relativo a la imagen obtenida en el microscopio confocal).

Como el área de los islotes de los animales transgénicos es mayor, el nº de células por islote también es mayor. Los islotes de controles y transgénicos correlacionan totalmente en el nº de células por  $\mu\text{m}^2$  de islote (densidad celular). Los resultados normalizados a un área de  $200000 \mu\text{m}^2$  implica 197,69 células en el modelo transgénico y 197,67 en los controles, **Tabla 34**.

**Tabla 35.** Datos de los estudios de morfometría en animales CD-1 RIP-IFN-beta. Los islotes de los animales transgénicos son más grandes pero la densidad celular beta es igual en ambos grupos,  $**p < 0,01$ .

Colonia	nº animales	Islotes analizados	Área media ( $\mu\text{m}^2$ )	Densidad: células/ $2 \times 10^4 \mu\text{m}^2$
CD-1	10	436	$12.685,98 \pm 543,29$	197,67
CD-1 Tg	12	502	$17.231,380 \pm 769,84 (**)$	197,69

El área media de los islotes de los animales transgénicos es superior a la de sus controles debido a que poseen un número mayor de células.

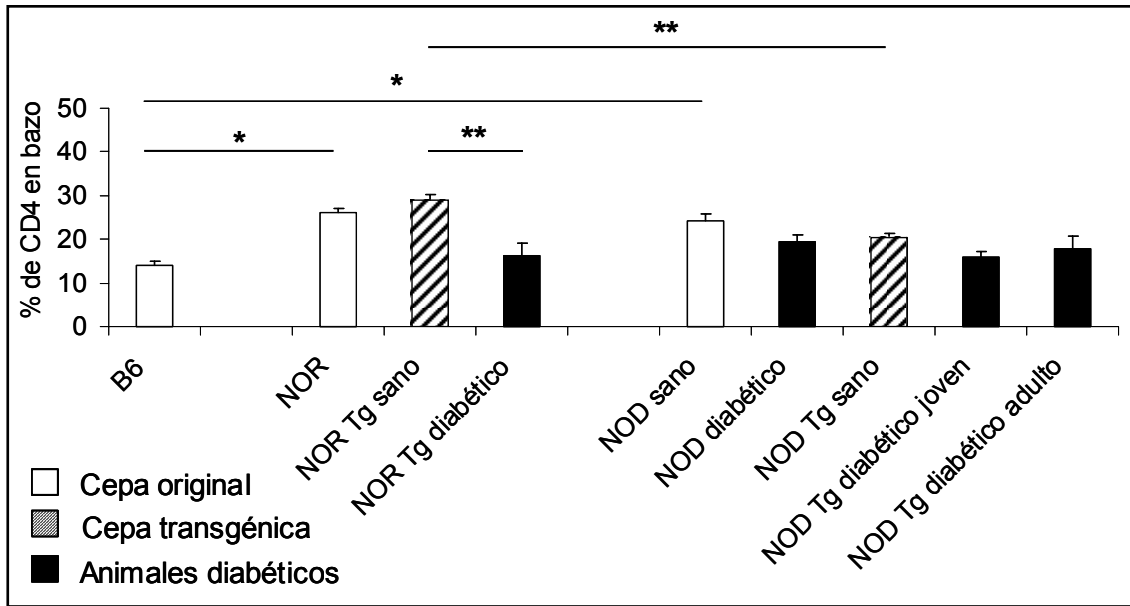
## 5. Cuantificación relativa de las subpoblaciones linfocitarias

Dado que se ha detectado la presencia de IFN-beta a nivel sistémico y esta citocina tiene propiedades inmunomoduladoras, se han analizado cambios en diferentes poblaciones linfocitarias. Se han determinado los porcentajes relativos de linfocitos CD4, CD8, B y células NK y NKT en los diferentes grupos en estudio a nivel periférico, en bazo y ganglios regionales pancreáticos y a nivel local en los linfocitos infiltrantes de páncreas.

### 5.1 El desarrollo de diabetes se asocia a variaciones en las poblaciones esplénicas en los animales transgénicos

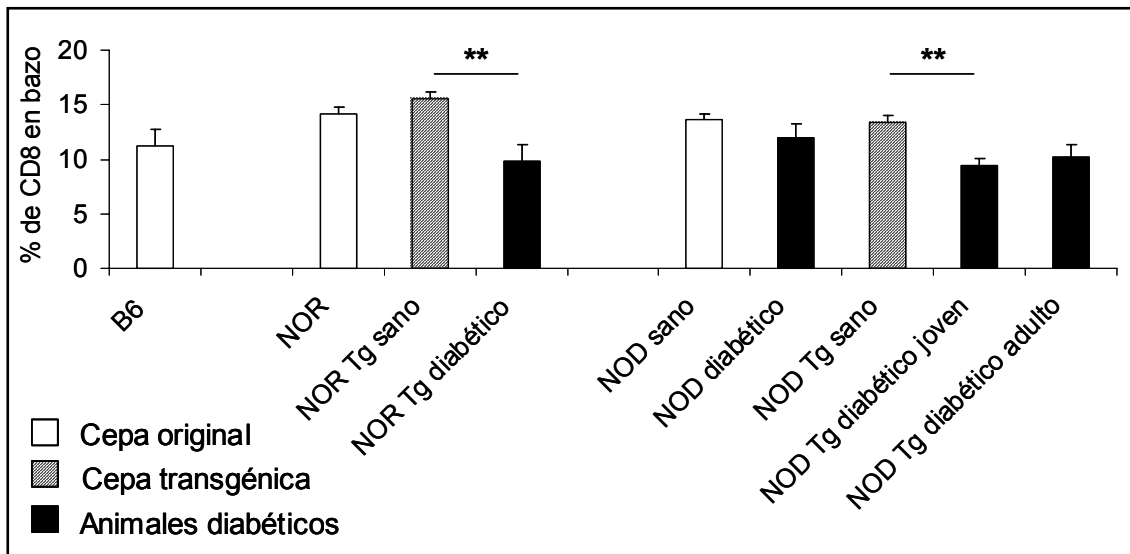
Los porcentajes relativos de las subpoblaciones esplénicas de linfocitos CD4, CD8, B y células NK y NKT de los diferentes grupos en estudio se muestran en la **Tabla 36**.

- Como ya se ha descrito en la literatura, los animales de la cepa C57BL/6J presentan unas proporciones de linfocitos CD4 esplénicos inferiores a los de las cepas NOD y NOR<sup>355</sup>. Los animales sanos NOR RIP-HuIFN-beta muestran una proporción de linfocitos CD4 similar a sus controles NOR. En cambio, los animales NOR RIP-HuIFN-beta diabéticos presentan una disminución significativa de esta población esplénica respecto al grupo de NOR RIP-HuIFN-beta sanos ( $p < 0,01$ ). El porcentaje de CD4 está aumentado en los individuos sanos NOR RIP-HuIFN-beta respecto a sus homólogos sanos transgénicos en *background* genético NOD ( $p < 0,01$ ). En el grupo de animales en fondo genético susceptible a la enfermedad, no existen diferencias significativas en los porcentajes de CD4 esplénicos entre grupos homólogos (**Figura 45**).



**Figura 45.** Porcentaje de linfocitos T CD4+ en los bazos de los diferentes grupos de estudio, \*p<0,05; \*\*p<0,01

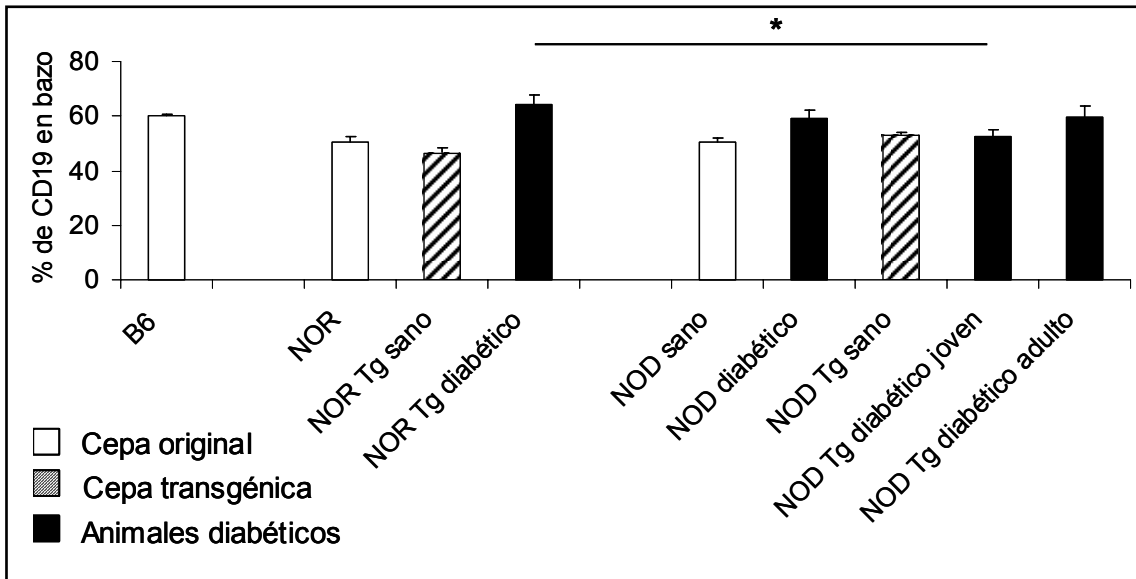
- No existen diferencias en los porcentajes de linfocitos CD8 entre animales transgénicos y controles. Los animales transgénicos que desarrollan la enfermedad a edades tempranas (3-5 semanas de vida) muestran una disminución de las proporciones de linfocitos CD8 esplénicos respecto a sus homólogos transgénicos sanos (**Figura 46**).



**Figura 46.** Porcentaje de linfocitos T CD8+ esplénicos de los diferentes grupos de estudio, \*p<0,05; \*\*p<0,01

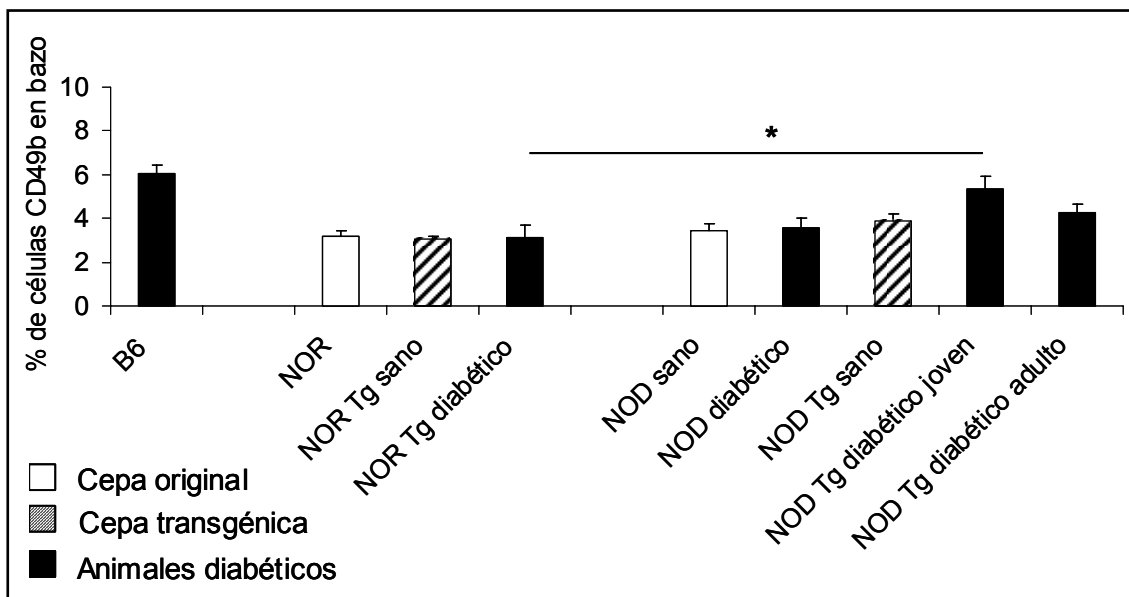
- Al determinar la proporción relativa de linfocitos B en bazo se observa que los animales NOR RIP-HuIFN-beta diabéticos muestran unos

porcentajes superiores de esta población respecto a los NOD RIP-HuIFN-beta diabéticos jóvenes ( $p < 0,05$ ), **Figura 47**.



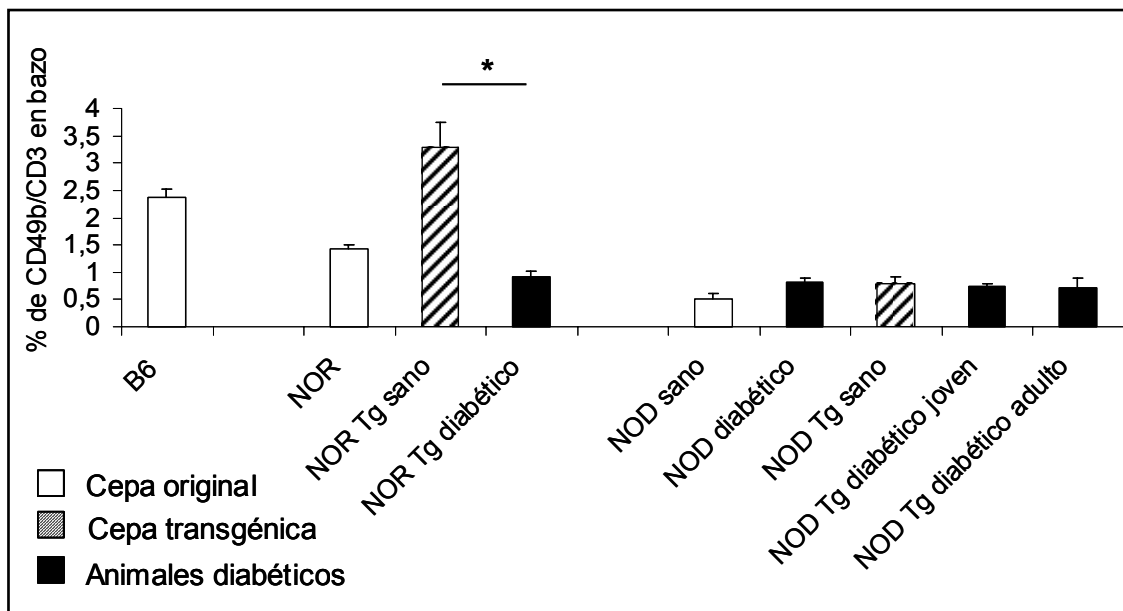
**Figura 47.** Porcentaje de linfocitos B esplénicos de los diferentes grupos de estudio,  $*p < 0,05$ .

- Respecto a los porcentajes de células NK, no existen diferencias entre animales sanos pero los ratones NOR RIP-HuIFN-beta diabéticos poseen a nivel esplénico unos porcentajes inferiores a los NOD RIP-HuIFN-beta diabéticos jóvenes ( $p < 0,05$ ), **Figura 48**.



**Figura 48.** Porcentaje de células NK esplénicas de los diferentes grupos de estudio,  $*p < 0,05$ .

- La diabetes en los animales NOR RIP-HuIFN-beta se asocia a una disminución significativa en los porcentajes de células NKT esplénicas respecto a los animales sanos ( $p < 0,05$ ), **Figura 49**.



**Figura 49.** Porcentaje de células NKT esplénicas de los diferentes grupos de estudio,  $*p < 0,05$ .

En resumen, la presencia de HuIFN-beta no implica una variación en los porcentajes relativos de las poblaciones esplénicas en los animales transgénicos respecto a sus controles en condiciones de salud. Los porcentajes relativos de linfocitos T esplénicos, tanto CD4 como CD8, muestran una disminución en animales diabéticos transgénicos en background NOR respecto a sus homólogos sanos. En fondo genético NOD se observa una disminución de los linfocitos CD8+ en los animales transgénicos diabéticos jóvenes respecto a los transgénicos sanos o diabéticos adultos. El porcentaje de linfocitos B es superior en los animales NOR RIP-HuIFN-beta diabéticos cuando se comparan con sus homólogos diabéticos en *background* genético NOD. Las proporciones de células NK esplénicas son inferiores en los ratones NOR RIP-HuIFN-beta diabéticos respecto a los NOD RIP-HuIFN-beta diabéticos. El desarrollo de diabetes clínica en animales transgénicos implica variaciones en las subpoblaciones esplénicas analizadas.

**Tabla 36.** Porcentaje de las diferentes subpoblaciones linfocitarias esplénicas de los diferentes modelos murinos de estudio.**Background genético resistente**

Subpoblación linfocitaria	B6	NOR	NOR Tg sano	NOR Tg diabético
<b>CD4</b>	14,15 ± 0,88	26,21 ± 1	29,12 ± 1,22	16,2 ± 2,8
<b>CD8</b>	11,42 ± 1,14	14,11 ± 0,62	16,13 ± 0,71	9,781 ± 1,61
<b>B</b>	60,46 ± 0,54	50,65 ± 1,81	45,45 ± 2,01	64,03 ± 3,63
<b>NK</b>	5,34 ± 0,75	3,168 ± 0,27	2,79 ± 0,20	3,148 ± 0,56
<b>NKT</b>	2,36 ± 0,16	2,759 ± 0,31	3,28 ± 0,45	1,689 ± 0,17

**Background genético susceptible**

Subpoblación linfocitaria	NOD sano	NOD diabético	NOD Tg sano	NOD Tg diabético joven	NOD Tg diabético adulto
<b>CD4</b>	24,08 ± 1,73	19,37 ± 1,80	20,28 ± 1,12	16 ± 1,09	17,81 ± 2,97
<b>CD8</b>	13,63 ± 0,56	11,93 ± 1,37	13,38 ± 0,63	9,466 ± 0,54	10,25 ± 1,11
<b>B</b>	50,43 ± 1,77	59,1 ± 3,15	52,91 ± 1,21	52,36 ± 2,87	59,76 ± 3,79
<b>NK</b>	3,432 ± 0,32	3,551 ± 0,48	3,871 ± 0,30	5,367 ± 0,53	4,277 ± 0,35
<b>NKT</b>	2,318 ± 0,39	1,929 ± 0,27	2,622 ± 0,22	2,309 ± 0,21	2,88 ± 0,30



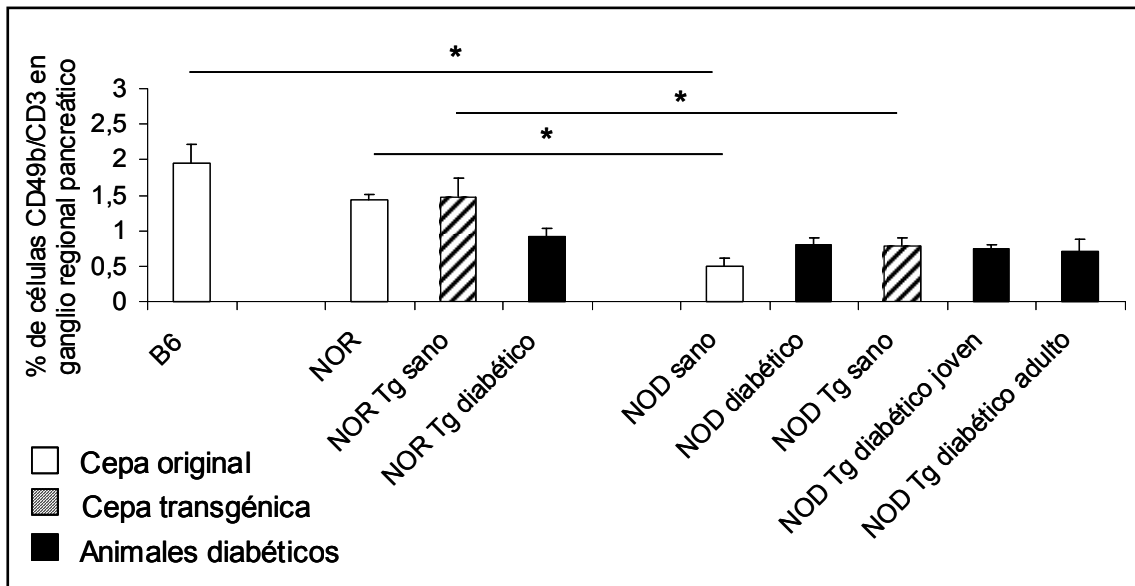
## **5.2 La expresión del transgén no determina variaciones en las subpoblaciones linfocitarias de ganglio regional pancreático**

Se han determinado los porcentajes relativos de las subpoblaciones de linfocitos CD4, CD8, B y células NK y NKT en ganglios regionales pancreáticos en los diferentes grupos en estudio (**Tabla 37**).

No se observan diferencias en las subpoblaciones de CD4, CD8, B, NK y NKT entre los animales transgénicos y sus respectivos controles. Tampoco se han encontrado diferencias entre animales sanos y diabéticos en estas subpoblaciones independientemente de la expresión del transgén. Se observan diferencias en las proporciones de algunas poblaciones linfocitarias entre las cepas originales:

- una disminución del porcentaje de linfocitos T CD4 en la cepa resistente C57BL/6J respecto a las cepas NOD y NOR
  
- un porcentaje de linfocitos T CD8 inferior en la cepa NOR respecto a la cepa C57BL/6J
  
- un porcentaje superior en las células NK en la cepa NOD respecto a la cepa resistente C57BL/6J
  
- un porcentaje de células NKT superior en la cepa C57BL/6J respecto a las cepas NOD y NOR

El porcentaje de células NKT es superior en los animales NOR RIP-HuIFN-beta cuando se comparan con sus homólogos transgénicos en *background* genético NOD (**Figura 50**).



**Figura 50.** Porcentaje de células NKT en ganglio regional pancreático de los diferentes grupos de estudio, \*p<0,05.

Por tanto, la presencia del transgén y el desarrollo de DT1, no implica alteración en las proporciones relativas de las diferentes subpoblaciones a nivel de ganglio regional pancreático.

**Tabla 37.** Porcentaje de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en ganglio regional pancreático de los diferentes modelos murinos de estudio.

**Background genético resistente**

Subpoblación linfocitaria	B6	NOR	NOR Tg sano	NOR Tg diabético
<b>CD4</b>	38,51 ± 2,13	51,96 ± 3,07	46,22 ± 2,28	50,71 ± 2,28
<b>CD8</b>	26,97 ± 1,94	19,01 ± 1,30	24,64 ± 0,88	19,88 ± 0,65
<b>B</b>	28,67 ± 2,11	24,32 ± 3,43	26,01 ± 2,70	27,58 ± 2,45
<b>NK</b>	1,10 ± 0,12	0,63 ± 0,11	0,60 ± 0,08	0,65 ± 0,07
<b>NKT</b>	1,95 ± 0,26	1,43 ± 0,07	1,46 ± 0,27	0,92 ± 0,10

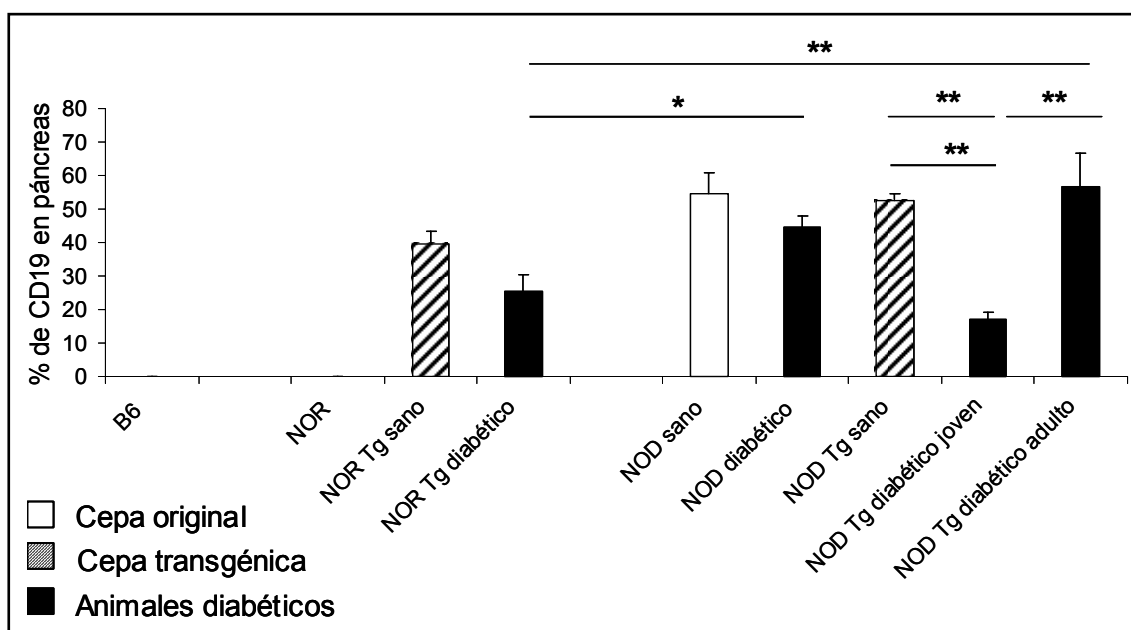
**Background genético susceptible**

Subpoblación linfocitaria	NOD sano	NOD diabético	NOD Tg sano	NOD Tg diabético joven	NOD Tg diabético adulto
<b>CD4</b>	54,19 ± 1,61	51,42 ± 3,82	52,94 ± 1,64	56,79 ± 1,18	53,71 ± 3,13
<b>CD8</b>	24,44 ± 2,42	21,42 ± 2,03	23,42 ± 0,84	21,1 ± 0,62	23,3 ± 3,39
<b>B</b>	18,38 ± 1,3	24,43 ± 6,19	20,02 ± 1,94	18,93 ± 0,93	20,22 ± 5,55
<b>NK</b>	0,2657 ± 0,05	0,40 ± 0,07	0,67 ± 0,21	0,3313 ± 0,04	0,2367 ± 0,35
<b>NKT</b>	0,5029 ± 0,10	0,81 ± 0,08	0,79 ± 0,11	0,7473 ± 0,05	0,7067 ± 0,18

### 5.3 El porcentaje de células NK a nivel pancreático se incrementa en animales transgénicos diabéticos jóvenes

Se han analizado los porcentajes relativos de las subpoblaciones de linfocitos CD4, CD8, B y células NK y NKT en páncreas de los diferentes grupos en estudio para determinar variaciones derivadas de la expresión local de HulfN-beta (**Tabla 37**).

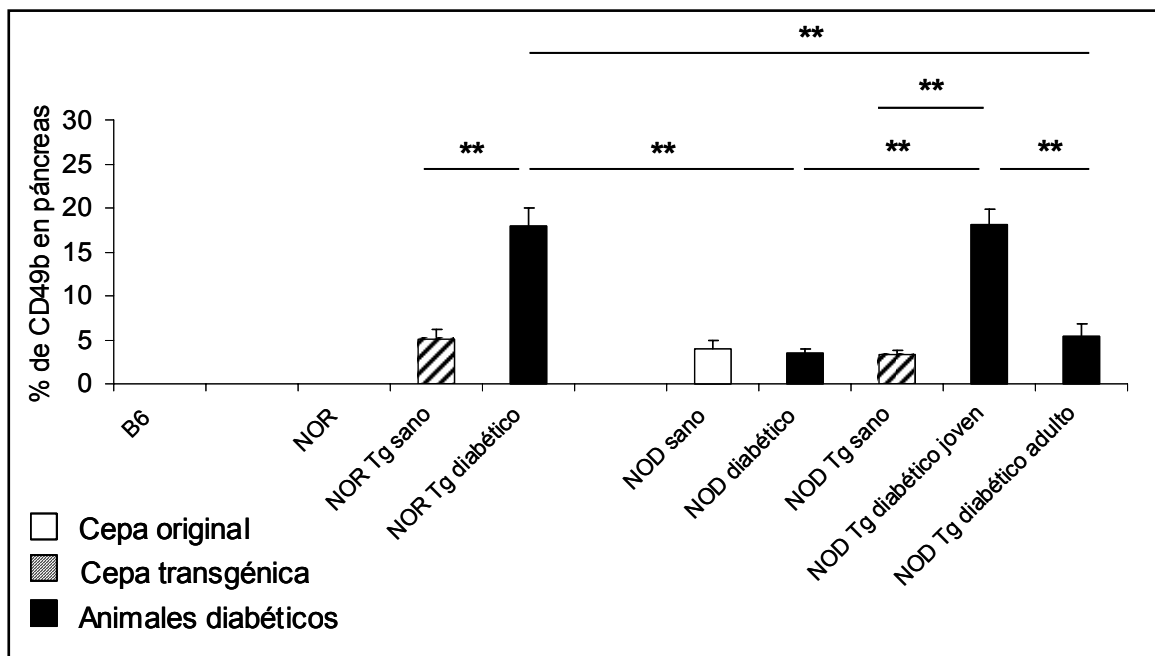
- A nivel de páncreas, no se observan diferencias entre los grupos en estudio en los porcentajes relativos de linfocitos T, tanto CD4 como CD8.
- No existen diferencias en los porcentajes de linfocitos B pancreáticos entre los grupos de animales en *background* genético NOR. En los animales en fondo genético NOD, se observa que la proporción de linfocitos B es inferior en los animales NOD RIP-HulfN-beta diabéticos respecto a los transgénicos sanos, transgénicos diabéticos adultos (después de las 12 semanas) y NOD diabéticos ( $p < 0,01$ ). La proporción de células B también es inferior en los animales NOR RIP-HulfN-beta diabéticos respecto a NOD RIP-HulfN-beta diabéticos adultos -después de las 12 semanas- ( $p < 0,01$ ) y NOD diabéticos ( $p < 0,05$ ), pero no respecto a NOD RIP-HulfN-beta diabéticos jóvenes (**Figura 51**).



**Figura 51.** Porcentaje de linfocitos B en infiltrado pancreático de los diferentes grupos de estudio, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

El desarrollo de diabetes en animales transgénicos jóvenes, se asocia a una disminución de la proporción de linfocitos B infiltrantes pancreáticos.

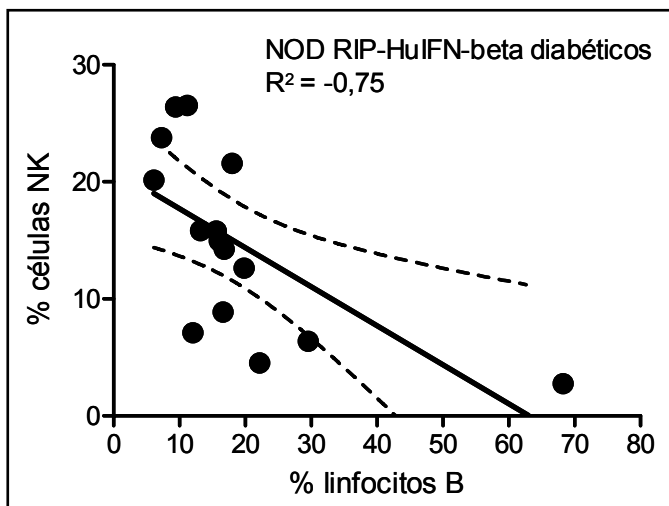
- El porcentaje de células NK a nivel pancreático en NOR RIP-HuIFN-beta diabéticos es superior a sus homólogos transgénicos sanos ( $p < 0,01$ ). En *background* NOD este porcentaje es superior en NOD RIP-HuIFN-beta diabéticos jóvenes (inicio clínico a las 3-5 semanas) respecto a animales transgénicos sanos, NOD RIP-HuIFN-beta diabéticos adultos (a partir de las 12 semanas de edad) y NOD diabéticos ( $p < 0,01$ ). La proporción de células NK también es superior en los animales NOR RIP-HuIFN-beta diabéticos respecto a transgénicos diabéticos adultos y NOD diabéticos ( $p < 0,01$ ), pero no respecto a NOD RIP-HuIFN-beta diabéticos jóvenes (**Figura 52**).



**Figura 52.** Porcentaje de células NK en infiltrado pancreático de los diferentes grupos de estudio, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

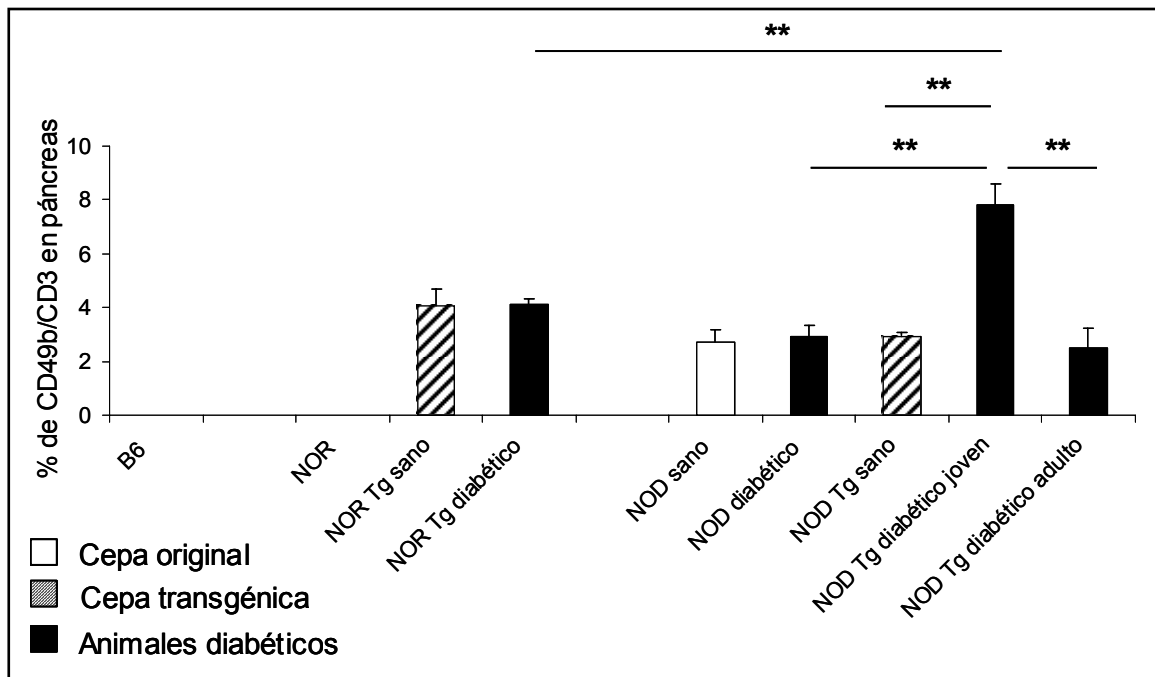
El porcentaje de células NK a nivel pancreático se incrementa en animales transgénicos diabéticos que desarrollan la enfermedad a edades muy tempranas (entre las 3-5 semanas de vida) respecto al resto de grupos en estudio.

En animales NOD RIP-HuIFN-beta diabéticos jóvenes existe una correlación inversa entre el porcentaje de células NK y linfocitos B a nivel pancreático (**Figura 53**).



**Figura 53.** Correlación entre el porcentaje de células NK y linfocitos B a nivel pancreático en animales NOD-RIP-HuIFN-beta

- El porcentaje de células NKT a nivel pancreático es superior en el grupo de NOD RIP-HuIFN-beta diabéticos jóvenes respecto a sus homólogos transgénicos sanos pero también respecto al resto de grupos diabéticos: NOD RIP-HuIFN-beta diabéticos adultos, NOD diabéticos y NOR RIP-HuIFN-beta diabéticos ( $p < 0,01$ ), **Figura 54**.



**Figura 54.** Porcentaje de células NKT en infiltrado pancreático de los diferentes grupos de estudio, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

En animales NOD, la expresión del transgén y el desarrollo de diabetes, se relaciona con un incremento en la proporción de células NKT a nivel pancreático.

**Tabla 37.** Porcentaje de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en páncreas de los diferentes modelos murinos de estudio.**Background genético resistente**

Subpoblación linfocitaria	NOR Tg sano	NOR Tg diabético
<b>CD4</b>	24,26 ± 3,00	18,79 ± 1,13
<b>CD8</b>	7,33 ± 1,12	8,721 ± 1,55
<b>B</b>	39,69 ± 3,74	25,3 ± 5,20
<b>NK</b>	5,1 ± 1,14	18 ± 2,00
<b>NKT</b>	4,07 ± 0,59	4,1 ± 0,24

**Background genético susceptible**

Subpoblación linfocitaria	NOD sano	NOD diabético	NOD Tg sano	NOD Tg diabético joven	NOD Tg diabético adulto
<b>CD4</b>	20,13 ± 4,12	21,04 ± 1,76	21,88 ± 0,97	22,72 ± 1,22	14,6 ± 3,74
<b>CD8</b>	6,3 ± 1,35	8,59 ± 0,69	6,48 ± 0,82	6,98 ± 1,01	6,03 ± 0,82
<b>B</b>	54,64 ± 6,35	44,74 ± 3,04	53,43 ± 1,68	16,99 ± 2,08	56,85 ± 9,86
<b>NK</b>	3,93 ± 0,95	3,57 ± 0,44	3,36 ± 0,37	18,03 ± 1,88	5,41 ± 1,48
<b>NKT</b>	2,73 ± 0,44	2,92 ± 0,38	2,90 ± 0,18	7,79 ± 0,79	2,51 ± 0,71



## 6. La enfermedad se transfiere mediante esplenocitos o linfocitos infiltrantes de páncreas de animales diabéticos a animales inmunodeficientes

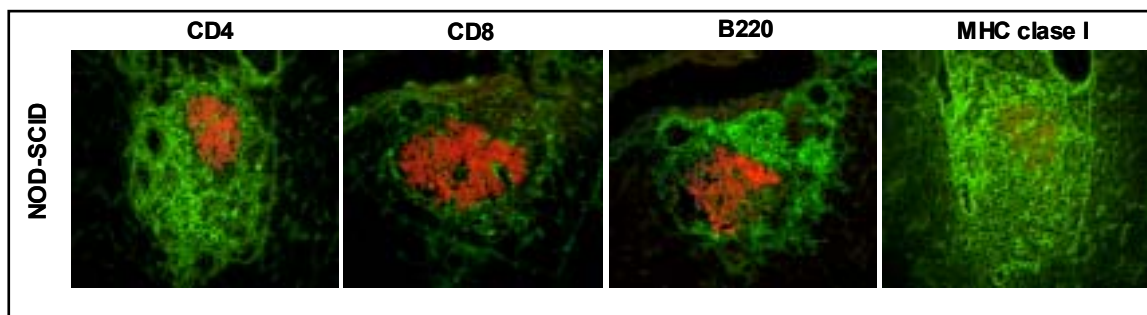
Los experimentos de transferencia de la enfermedad se han realizado para determinar el carácter autoinmune de la diabetes en este modelo transgénico (**Tabla 38**).

- La transferencia de esplenocitos o linfocitos intrapancreáticos de animales diabéticos de las cepas NOD RIP-HuIFN-beta y NOR RIP-HuIFN-beta a animales NOD-SCID, implica el desarrollo de la enfermedad en estos animales entre las 8 y las 15 semanas post-transferencia. La transferencia de esplenocitos de animales de la cepa NOR a ratones NOD-SCID no implica el desarrollo de la enfermedad en ninguno de los animales transferidos a las 30 semanas de seguimiento.
- La inyección de esplenocitos de animales NOD RIP-HuIFN-beta diabéticos a ratones NOD RIP-HuIFN-beta en fase pre-diabética, implica un desarrollo de la enfermedad de forma muy aguda, en 3-6 días después de la transferencia.
- La transferencia de esplenocitos diabetogénicos de NOD RIP-HuIFN-beta a animales de la cepa NOD-SCID RIP-HuIFN-beta implica el desarrollo de la enfermedad a las 8 semanas post-transferencia.

**Tabla 38.** Resumen de las transferencias adoptivas de la enfermedad

Donante	Receptor	Objetivo	DT1	tiempo
NOD diabético	NOD-SCID	Transferencia de la enfermedad	SÍ	4,5-9 semanas
NOD RIP-HuIFN-beta diabético	NOD-SCID	Transferencia de la enfermedad	SÍ	4-15 semanas
NOR RIP-HuIFN-beta diabético	NOD-SCID	Transferencia de la enfermedad	SÍ	8 semanas
NOD RIP-HuIFN-beta diabetico	NOD RIP-HuIFN-beta	Aceleración de la enfermedad	SÍ	3-6 días
NOR sano	NOD-SCID	Transferencia de la enfermedad	NO	-
NOD RIP-HuIFN-beta diabético	NOD-SCID RIP-HuIFN-beta	Aceleración de la enfermedad	SÍ	8 semanas

El estudio mediante inmunofluorescencia indirecta de los páncreas de animales diabéticos a consecuencia de la transferencia, muestran un patrón de infiltración similar al de los animales diabéticos NOD y NOR RIP-HuIFN-beta, (Figura 54).



**Figura 54.** Doble inmunofluorescencia indirecta de criosecciones de páncreas de NOD-SCID diabético tras transferencia de esplenocitos de NOD RIP-HuIFN-beta diabético. En rojo se muestra la tinción para insulina y en verde los marcadores específicos para linfocitos T CD4 y CD8, linfocitos B y MHC de clase I.

Por tanto, el trasplante de linfocitos derivados de animales diabéticos que expresan HuIFN-beta supone, en todos los casos, la transferencia de la enfermedad por lo que se confirma el carácter autoinmune de la misma.

## 7. El IFN-beta humano no afecta a la expresión tímica de moléculas insulares

Dado que el HuIFN-beta se detecta a nivel sistémico y podría expresarse a nivel tímico debido al promotor del transgén, su efecto local podría afectar a la expresión de moléculas a nivel tímico. Se han realizado RT-PCR de distintos órganos de animales CD-1 y CD-1 transgénicos. Los resultados se han expresado como el cociente entre la expresión de los genes en estudio (preproinsulina 1, preproinsulina 2, IFN-beta humano, glucagón y  $\beta_2$ -microglobulina) respecto al gen constitutivo  $\beta$ -actina.

La insulina 2, se expresa a nivel de páncreas pero también en hígado y timo, de acuerdo con lo descrito en la literatura<sup>381</sup>. La insulina 1 se expresa sólo a nivel de páncreas.

El HuIFN-beta se detecta en páncreas y timo de los animales transgénicos, pero no en los controles, siendo la expresión tímica ( $0.00085 \pm 0.00024$ ) unas 100 veces inferior a la pancreática ( $0,095 \pm 0,011$ ) de forma

paralela a la expresión de insulina 2. La expresión del transgén no se detecta en hígado.

Al analizar la expresión relativa de  $\beta_2$ -microglobulina en tejido pancreático Existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los animales transgénicos ( $3,19 \pm 0,55$ ) y sus controles ( $1,21 \pm 0,2$ ), lo que sugiere una hiperexpresión de MHC de clase I en este órgano en los animales transgénicos. En timo, la expresión de  $\beta_2$ -microglobulina es similar en ambos grupos de animales por lo que no se esperan diferencias en la expresión de MHC I que puedan alterar el microambiente tímico.

El resto de genes muestran similar expresión en los órganos en estudio de ambos grupos de animales. La expresión de glucagón no muestra diferencias estadísticamente significativas entre CD-1 y CD-1 HuRIP-IFN-beta en los órganos en que se expresa, páncreas y timo (**Tabla 39**).

**Tabla 39.** Cuantificación de diferentes genes en timo, páncreas e hígado de animales CD-1 y CD-1 HuRIP-IFN-beta. Los valores corresponden al cociente del n° de copias del producto a estudiar respecto al n° de copias de  $\beta$ -actina. \* $p < 0,05$

		<b>TIMO</b>	
marcador \ colonia		CD-1	CD-1 RIP-HuIFN-beta
<b>preproinsulina I</b>		-	-
<b>preproinsulina II</b>		$0,091 \pm 0,005$	$0,082 \pm 0,005$
<b>HuIFN-<math>\beta</math></b>		-	$0,00085 \pm 0,00024$
<b><math>\beta_2</math>-microglobulina</b>		$0,9 \pm 0,12$	$1 \pm 0,16$
<b>glucagón</b>		$0,01 \pm 0,0016$	$0,0078 \pm 0,0010$

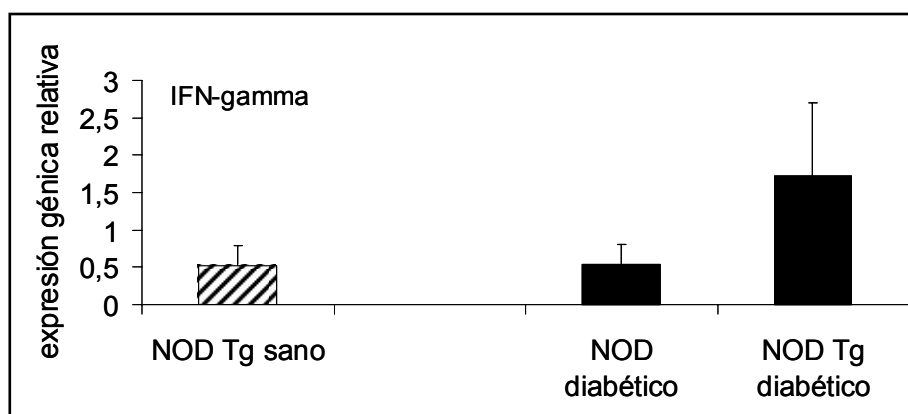
		<b>PÁNCREAS</b>	
marcador \ colonia		CD-1	CD-1 RIP-HuIFN-beta
<b>preproinsulina I</b>		$3,81 \pm 0,35$	$4,17 \pm 1,32$
<b>preproinsulina II</b>		$11,54 \pm 3,06$	$8,92 \pm 1,88$
<b>huIFN-<math>\beta</math></b>		-	$0,095 \pm 0,011$
<b><math>\beta_2</math>-microglobulina</b>		$1,21 \pm 0,2$ (*)	$3,19 \pm 0,55$ (*)
<b>glucagón</b>		$2,25 \pm 0,57$	$1,99 \pm 0,37$

marcador \ colonia		HÍGADO	
		CD-1	CD-1 RIP-HuIFN-beta
<b>preproinsulina I</b>		-	-
<b>preproinsulina II</b>		0,34 ± 0,12	0,44 ± 0,06
<b>HuIFN-β</b>		-	-
<b>β2-microglobulina</b>		8,04 ± 1,34	6,22 ± 0,52
<b>glucagón</b>		-	-

## 8. Presencia de IFN-gamma en el infiltrado de los animales RIP-HuIFN-beta

Se ha analizado la expresión relativa de IFN-gamma respecto al gen constitutivo 18s en el infiltrado insular de animales NOD y NOD RIP-HuIFN-beta, tanto sanos como diabéticos, como citocina secretada por linfocitos T y células NKs. Las muestras, obtenidas mediante LCM, son en el caso de los animales sanos infiltrado insular y en el caso de los animales diabéticos ha sido tejido endocrino con el infiltrado correspondiente.

El infiltrado insular de sujetos transgénicos prediabéticos (9 semanas) expresa IFN-gamma. En sujetos NOD prediabéticos, algunos animales expresan IFN-gamma y otros no, como ya han descrito otros grupos debido a la variabilidad de esta cepa en estado prediabético. Al inicio clínico de la DT1, el infiltrado de sujetos transgénicos expresa niveles de IFN-gamma que estadísticamente no difieren del modelo control ni de la situación prediabética, aunque se aprecia una tendencia al aumento (**Figura 55**).



**Figura 55.** Expresión génica relativa de IFN-gamma respecto a 18s en infiltrado insular de NOD RIP-HuIFN-beta sanos, NOD RIP-HuIFN-beta diabéticos y NOD diabéticos.

La expresión insular relativa de IFN-gamma no muestra diferencias entre las muestras de los animales NOD-HuIFN-beta que presentan diabetes acelerada y los ratones NOD diabéticos. Sin embargo, la expresión de esta citocina apoya una respuesta autoinmune Th1.

## **9. Los animales transgénicos diabéticos expresan MULT-1 a nivel insular**

Se ha analizado la expresión relativa de las moléculas RAE-1<sup>382</sup>, H60<sup>383</sup> y MULT-1<sup>384</sup>, que son ligandos activadores de las células NK a través del receptor NKG2D, con el objetivo de determinar una activación de este tipo celular en el infiltrado de los animales transgénicos que presentan un aumento de esta población en el infiltrado insular al inicio clínico de la enfermedad. La expresión se ha analizado mediante RT-PCR en tejido endocrino de animales sanos NOD, NOD RIP-HuIFN-beta, NOD-SCID, NOD-SCID RIP-HuIFN-beta y C57 y en tejido endocrino con infiltrado de animales diabéticos NOD y NOD RIP-HuIFN-beta de muestras obtenidas mediante LCM. Como control positivo se ha utilizado material extraído de células YAC-1, línea celular derivada de un linfoma murino que se utiliza como diana en ensayos de citotoxicidad con NKs y que hiperexpresa estos ligandos activadores de células NK.

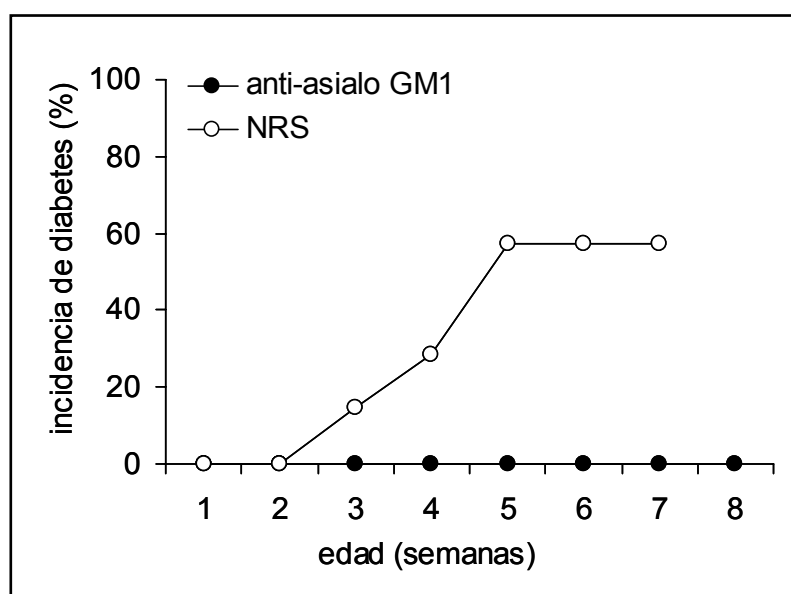
La expresión de moléculas de RAE-1 y de H60 ha sido indetectable en todas las muestras excepto en el control positivo.

La expresión de la molécula MULT-1 no se detecta excepto en las muestras de los animales transgénicos diabéticos, con una expresión génica relativa respecto a gen de 18s de  $1,82 \pm 1,02$ .

## **10. Las células NK son determinantes para el desarrollo de la diabetes acelerada**

Para determinar la importancia de las células NK en el desarrollo de la diabetes acelerada en los animales NOD RIP-HuIFN-beta, se ha administrado el anticuerpo policlonal bloqueante anti-AGM1 a 6 animales de esta condición y NRS a 7 animales transgénicos positivos como controles.

Se ha determinado que el anticuerpo bloqueante de células NK previene el desarrollo de diabetes acelerada en el 100% de los casos. A las 14 semanas de vida, ninguno de los animales NOD RIP-HuIFN-beta a los que se ha administrado el anticuerpo ha desarrollado la enfermedad mientras que la mayoría de los animales control han presentado un inicio clínico a las 4 semanas de vida. En estos animales diabéticos, el porcentaje de células NK en el infiltrado (determinado mediante citometría de flujo) es el mismo que en animales transgénicos que presentan diabetes acelerada (9-12% de células NK).



**Figura 56.** Incidencia acumulada de diabetes en animales NOD RIP-HuIFN-beta a los que se ha inactivado las células NK (anti-asialo GM1) y en sus controles (NRS).

Según estos resultados, las células NK juegan un papel determinante en el desarrollo de la DT1 acelerada que presenta el modelo transgénico NOD RIP-HuIFN-beta.

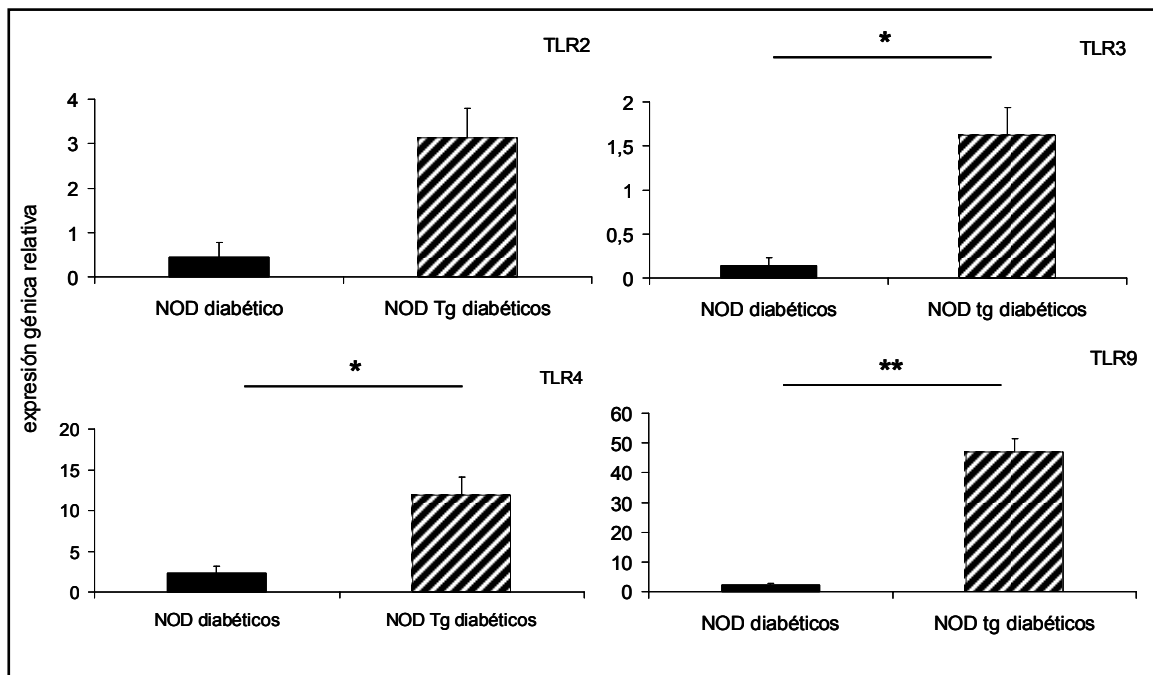
## **11. Los animales transgénicos diabéticos presentan una elevada expresión de TLRs relacionados con infección vírica**

Se ha determinado mediante RT-PCR la expresión génica relativa de TLRs en los diferentes grupos de estudio. El material de estudio ha sido tejido endocrino de animales sanos NOD, NOD RIP-HuIFN-beta, NOD-SCID, NOD-SCID RIP-HuIFN-beta y C57 y en tejido endocrino con infiltrado de animales

diabéticos NOD y NOD RIP-HuIFN-beta. El tejido se ha obtenido mediante LCM de secciones de páncreas de animales de cada grupo. Se ha determinado la expresión de TLR2, TLR3, TLR4, TLR-7 y TLR9, que son receptores de la inmunidad natural que se han relacionado con infecciones víricas<sup>2</sup>.

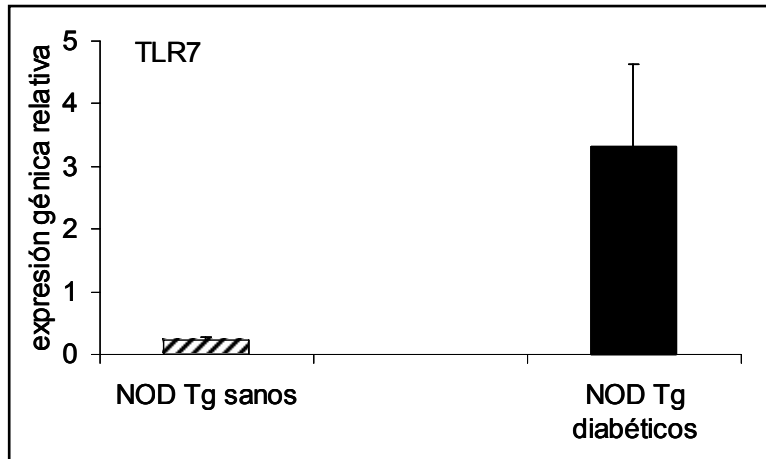
Los animales diabéticos transgénicos muestran unos niveles de expresión de TLR3, TLR4 y TLR9 estadísticamente superior a los animales diabéticos del grupo de NOD (**Figura 57**). Aunque el nivel de expresión de TLR2 es 7 veces superior en el grupo de animales diabéticos transgénicos, las diferencias respecto a los animales diabéticos NOD no son estadísticamente significativas, probablemente debido al tamaño de la muestra.

Respecto a los animales no diabéticos, la expresión de estas moléculas a nivel endocrino no muestra diferencias entre animales transgénicos y animales de otros grupos.



**Figura 57.** Expresión génica relativa de TLR2, TLR3, TLR4 y TLR9 en animales diabéticos NOD y NOD RIP-HuIFN-beta.

La expresión de TLR7 sólo se ha detectado en el modelo NOD RIP-HuIFN-beta. La expresión génica relativa es 15 veces superior en los animales diabéticos respecto a los animales sanos (**Figura 58**).



**Figura 58.** Expresión génica relativa de TLR7 a nivel insular en animales NOD RIP-HuIFN-beta sanos y diabéticos.

La expresión de TLRs relacionados con una respuesta inmune inducida por una infección vírica, se encuentran incrementados en los animales NOD RIP-HuIFN-beta diabéticos respecto a los NOD diabéticos a nivel insular.



## DISCUSIÓN

Los estudios presentados en esta tesis se ha realizado con el fin de profundizar en las consecuencias que un infección vírica, en particular la respuesta inmune antiviral por parte del organismo, podría tener sobre el desarrollo de la DT1.

En la patogénesis de esta enfermedad está ampliamente aceptado que los factores ambientales desempeñan un papel determinante. Entre estos factores, cada vez adquiere más importancia la hipótesis de que algunos virus podrían estar implicados en el desarrollo de la enfermedad. Hasta la fecha, evidencias serológicas, epidemiológicas y estudios con modelos animales apoyan esta teoría, aunque de momento sólo se ha conseguido aislar en una ocasión un enterovirus del páncreas de un paciente diabético<sup>182</sup>. Diferentes virus se han relacionado con el desarrollo de diabetes en humanos y modelos animales<sup>220,385</sup>. Estudios en modelos animales<sup>228</sup> y cultivos de células beta humanas<sup>210</sup> demuestran que algunos virus pueden actuar directamente como citopáticos contra las células infectadas, pero habitualmente las lesiones tisulares son consecuencia de la respuesta inmune que el propio individuo desarrolla hacia las células infectadas. Se ha demostrado que algunas infecciones virales en el estado pre-clínico de la DT1 podrían influir en la progresión de la insulinitis, previniendo el desarrollo clínico de la enfermedad, si se producen en la localización anatómica, en el momento y con la intensidad adecuados<sup>386</sup>, correlacionando con algunos ensayos que previenen el desarrollo de la enfermedad en el modelo NOD mediante la administración de citocinas antivirales<sup>317,387</sup>.

Los IFN de tipo I constituyen la primera línea de defensa del organismo frente a las infecciones de origen vírico. Estas proteínas desempeñan tres funciones principales ante una infección vírica: impiden la replicación del virus activando genes que impiden la producción de proteínas víricas, inducen la expresión de MHC de clase I en las células no infectadas y activan las células NK que destruyen de forma selectiva a las células infectadas<sup>3</sup>. Otras funciones importantes son la potenciación de la actividad citotóxica de células T y NK, influyen en la capacidad presentadora de las APCs, favorecen la producción de citocinas proinflamatorias y la polarización hacia una respuesta Th1. Varias

evidencias relacionan la presencia de IFNs de tipo I con el desarrollo de DT1: se ha detectado un aumento de IFN de tipo I en el suero de pacientes afectados con enfermedades autoinmunes<sup>367</sup>, se han descrito casos de aparición súbita de DT1 en individuos que siguen tratamientos basados en IFN de tipo I indicados en esclerosis múltiple y ciertas enfermedades víricas<sup>369,370,371</sup>, se han detectado transcritos de estas moléculas en páncreas de pacientes diabéticos<sup>124,125,185</sup>, se ha demostrado un aumento de expresión de esta proteínas en la rata BB y el ratón NOD cuando se les induce diabetes farmacológicamente<sup>372</sup> y finalmente, los modelos animales que expresan transgénicamente IFN de tipo I en las células beta pancreáticas desarrollan DT1<sup>328,329,330,331</sup>.

En este trabajo se han generado por primera vez ratones transgénicos en *background* genético NOD y NOR que expresan un IFN de tipo I, en concreto IFN-beta, en las células productoras de insulina<sup>330</sup>. Se ha demostrado que la expresión de IFN-beta en los islotes es capaz de romper la tolerancia en animales genéticamente resistentes y acelerar la aparición de la enfermedad en fondos genéticos susceptibles. Se han descrito algunos modelos transgénicos expresando IFN-beta pero la mayor parte de ellos no han progresado por la toxicidad de la expresión del transgén. Un modelo transgénico murino expresando IFN-beta bajo el promotor sistémico de la metaloproteína I -generado en estudios de resistencia a infecciones víricas- fue descrito en 1988 pero a causa de la esterilidad de los machos la colonia no progresó<sup>388</sup>. El modelo transgénico que expresaba esta proteína bajo el promotor de la insulina de rata tampoco fue viable debido a la gran mortalidad por toxicidad sistémica debido a a la expresión del transgén que se producía en estos individuos (Dr T.A. Stewart, Genentech, San Francisco, CA, comunicación personal). El modelo transgénico que nosotros estudiamos, expresa IFN-beta humano bajo el promotor de la insulina de rata<sup>329</sup> por tanto hay una menor especificidad de la proteína por su receptor y permite la viabilidad de los individuos. Se ha descrito que los IFN son bastante especie-específicos y esta restricción puede compensarse con mayor concentración de la proteína. En nuestro caso, la afinidad de la citocina humana por el receptor murino es de unas 1000 veces inferior, compensándose así los efectos

adversos de las concentraciones elevadas pero asegurando un efecto biológico.

La colonia transgénica CD-1 RIP-IFN-beta desarrolla diabetes con una incidencia acumulada superior al modelo original en *background* C57BL6/SJL<sup>329</sup>. Curiosamente, sólo los machos han desarrollado la enfermedad. La razón por la que la incidencia en este grupo de animales no es muy elevada podría explicarse porque en los individuos heterocigotos aumenta el 'vigor híbrido' haciendo por un lado que los animales sean más resistentes al desarrollo de la enfermedad y que se diluyan más los genes de susceptibilidad. Esto explica que el modelo sea considerado más de prediabetes, ya que hay infiltrado, que de diabetes. Sin embargo, al tratarse de una colonia de animales genéticamente distintos, podría reflejar mejor la situación en la población humana que una cepa consanguínea: dado un agente desencadenante inicial en un grupo de sujetos (¿vírico?), cada uno puede responder con distinta eficiencia y por tanto, generar situaciones inflamatorias de distinta intensidad; esto haría que en algunos casos se superase la inflamación sin secuelas, en otros se 'cronificase' y en algunos, se destruyeran las células diana hasta un nivel que daría lugar a la aparición de síntomas clínicos evidentes.

Los retrocruzamientos para obtener animales transgénicos en *background* genético NOD y NOR han evidenciado un inicio clínico de la enfermedad a una edad más temprana, coincidiendo con el momento del destete, y con una incidencia acumulada final superior en ambas cepas respecto a los animales de la colonia CD-1. En los animales transgénicos en fondo genético NOR, resistente a la enfermedad, desarrollaron la enfermedad tanto machos como hembras con una incidencia superior en los machos y un inicio clínico temprano, lo que sugiere una rotura de la tolerancia en este modelo en principio resistente al desarrollo de DT1. En el caso de los animales que expresan IFN-beta en fondo genético NOD se observa una aceleración de la enfermedad y un aumento de la incidencia en los machos respecto a la cepa original NOD. El desarrollo del infiltrado en NOD se ha definido que ocurre a partir de los 15 días de vida<sup>389</sup>, y este 'retraso' se asocia más a una falta de antígeno disponible para estimular las células T-beta específicas que a una falta de células T o APCs: el(los) antígeno(s) estarían secuestrados hasta que hay un pico de apoptosis en este modelo, a los 5 días de vida<sup>390</sup>. Justo en el

momento del destete hay un aumento en la secreción de insulina debido al cambio de dieta: esta aceleración del metabolismo beta, podría asociarse a más antígeno disponible y paralelamente, más secreción de IFN-beta que estaría incrementando las 'señales de peligro' endógenas, haciendo a las células beta blanco del sistema inmune. El reclutamiento de células mononucleares a nivel insular podría acelerarse en estos animales por la hiperexpresión de clase I y el microambiente inflamatorio debido al producto del transgén en los islotes. En el modelo NOR no hay estudios sobre este tema pero dado que comparte mayoría del genoma con el NOD –y abundantes locus de susceptibilidad- podría compartir el mecanismo de apoptosis y posterior desarrollo del infiltrado a edad muy temprana.

Además, ningún animal transgénico F1(NODxC57BL/6J) ha desarrollado la enfermedad. Estos animales son heterocigotos para todos los alelos de su genoma, incluido el alelo de susceptibilidad H-2<sup>97</sup> que hereda de la genética NOD. Tanto los animales NOD como NOR son portadores de este alelo y otros de susceptibilidad en homocigosis, hecho que les hace más susceptibles a la enfermedad cuando se produce algún fenómeno que pueda romper la tolerancia, como podría ser el caso de la expresión de IFN en las células beta. Aunque el modelo NOR porte alelos de resistencia derivados del C57BL/6J<sup>355</sup>, ésto no parece ser suficiente protección para evitar que la expresión de HuIFN-beta determine el desarrollo de la enfermedad por parte de estos animales. Por tanto, la expresión transgénica de IFN-beta por las células beta pancreáticas en diferentes genéticas murinas aumenta la incidencia acumulada de DT1 en las cepas resistentes y acelera la aparición de la enfermedad en las cepas susceptibles.

La influencia del IFN-beta en todos los fondos genéticos estudiados, ha sido en todos los casos superior en machos que en hembras. Se ha descrito que los ratones macho tienen mayor dificultad en mantener la homeostasis de la glucosa en condiciones de deficiencia de la función celular beta y que sus islotes son más susceptibles al daño producido por un ataque autoinmune que los islotes de las hembras, pero en cambio, en condiciones estándar, los linfocitos específicos de islote son menos agresivos que en las hembras<sup>391</sup>. Dado que el IFN-beta aumenta la citotoxicidad de las células NK y los linfocitos T CD8, podría influir en que los islotes menos resistentes de los machos fuesen

los más susceptibles a padecer el ataque mediado por estos tipos celulares. Resultados similares a los nuestros se han descrito en los ratones transgénicos que expresan IFN $\kappa$  en las células beta, la incidencia de la enfermedad es superior en los machos que en las hembras (G. Vassileva, Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, NJ, comunicación personal). Asumiendo una etiología viral para la DT1 en humanos, las hembras parecen ser menos susceptibles que los machos a los factores ambientales infecciosos<sup>392</sup>.

La primera parte del estudio se encaminó a determinar si el transgén o su producto podrían estar causando algún efecto tóxico local sobre la célula beta y por consiguiente, que la diabetes en estos animales fuera de etiología tóxica. Esto se descartó por la correcta funcionalidad metabólica presente en las células beta, ya que los niveles séricos de insulina eran normales e incluso ligeramente superiores al grupo control así como el contenido pancreático de insulina. En caso de existir un efecto tóxico a nivel de célula beta, esperaríamos una disminución de los valores de insulina tanto a nivel sistémico como pancreático, por una afectación en el metabolismo, como sucede en el caso de la inducción química de la enfermedad mediante la administración de estreptozotocina, que es directamente tóxica para las células productoras de insulina. Este modelo transgénico presenta unos niveles de glicemia normales desde el nacimiento y tras la administración aguda de una concentración elevada de glucosa, los animales transgénicos vuelven a los niveles basales de glicemia en menos de dos horas, de forma similar a sus controles, lo que indica una correcta homeostasis de la glucosa. Tanto en animales transgénicos como controles, se ha observado una glicemia ligeramente superior en machos que en hembras. Esto es debido a que en roedores existe un dimorfismo sexual en la homeostasis de la glucosa debido a que los andrógenos ejercen un estado de resistencia a la insulina<sup>393</sup> y los estrógenos modulan la homeostasis de la glucosa de forma que elevan la concentración sérica de insulina y disminuyen la glicemia, aumentando la respuesta de la célula beta a la glucosa e induciendo hiperplasia de los islotes<sup>394</sup>.

Por otro lado, se ha descartado un efecto tóxico directo del transgén o su producto sobre las células beta porque el porcentaje y la distribución de las células insulares son normales y porque no se han detectado un número superior de células apoptóticas en los islotes de los animales transgénicos

respecto a los controles. El estudio de la morfología de los islotes de estos animales indica que los ratones transgénicos presentan islotes de mayor tamaño que sus controles. Este fenómeno, no se atribuye a una replicación activa de las células beta, ya que nuestros estudios en el modelo CD-1 indican que los animales transgénicos adultos no tienen un índice de replicación mayor que sus controles. La replicación es poco frecuente en las células beta de animales adultos<sup>395</sup> y este hecho se podría acentuar con la presencia del IFN localmente, ya que una de sus funciones es la de inhibir la replicación celular<sup>234</sup>. El tamaño de la célula beta tampoco es responsable de este incremento del área insular, ya que su tamaño no varía respecto a los controles. Se trataría entonces, de una ligera hiperplasia, es decir de un mayor número de células de los islotes en los animales RIP-IFN-beta de forma constitutiva. Se ha observado, con mayor frecuencia, la presencia de ciertos islotes de Langerhans excepcionalmente grandes en los páncreas de los animales transgénicos que en la literatura se describen en modelos murinos de diabetes espontánea como 'mega-islotes'<sup>396</sup>. El mecanismo de aparición de estos islotes no está muy claro. En ratones NOD en la fase prediabética se ha observado este tipo de islotes como una hiperfunción insular que resulta en mayores niveles de insulina plasmática. Esta hiperplasia de los islotes también se ha asociado al momento del inicio del infiltrado (formado por APCs) y su evolución se correlaciona temporalmente con el progreso de la insulinitis<sup>397</sup>. Esta hiperplasia podría ser un mecanismo compensatorio para equilibrar la disminución de la ratio peso del páncreas respecto al peso vivo del animal en los animales transgénicos cuando se comparan con sus controles. Dado que ambos grupos de animales no presentan diferencias en el tamaño de las células beta, en el modelo transgénico existen islotes más grandes formados por mayor número de células beta para compensar la masa celular beta en función del peso del animal, ya que en otros modelos experimentales se ha demostrado que existe una correlación lineal entre la masa celular beta y el peso vivo del animal<sup>375</sup>. Este fenómeno de hiperplasia de los islotes podría explicar el nivel de insulinemia superior en el grupo de animales RIP-IFN-beta respecto a sus controles, aunque siempre dentro de la normalidad.

En el ratón NOD, el modelo espontáneo de diabetes autoinmune más estudiado, la insulinitis se desarrolla en todos los animales pero la enfermedad

clínica se produce principalmente en hembras y con una incidencia variable en función de las condiciones de estabulación. El páncreas de los animales transgénicos RIP-HuIFN-beta, presenta una infiltración variable en función del *background* genético y esto correlaciona con la incidencia de diabetes en ese fondo genético. Mientras que los ratones CD-1 RIP-HuIFN-beta presentan una infiltración leve que aumenta con la edad del animal, los animales en *background* NOD y NOR presentan una severa infiltración desde edades muy tempranas y que se mantiene con la edad. Los animales diabéticos de todos los fondos genéticos presentan un grado de infiltración superior a sus homólogos sanos. Estos resultados indican que el fondo genético de los ratones que portan el haplotipo de susceptibilidad H-2<sup>g7</sup> no es suficiente para proteger a estos animales del desarrollo de diabetes incluso cuando portan otros alelos de resistencia no relacionados con el MHC, cuando se produce un daño que desencadena una respuesta inflamatoria local en los islotes. Los animales transgénicos que no portan este alelo de susceptibilidad, como la cepa C57BL/6J que portan el haplotipo H-2<sup>b</sup> o la cepa no consanguínea CD-1, o los animales que portan este alelo en heterocigosis, como es el caso de los animales F1(C57BL/6J x NOD), no desarrollan diabetes<sup>398</sup>.

La expresión del transgén -HuIFN-beta - se ha confirmado de forma local en los islotes de los animales transgénicos mediante inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo específico para IFN-beta humano y mediante la cuantificación de la expresión del transgén por RT-PCR. La expresión de esta citocina pro-inflamatoria a nivel local podría estar atrayendo células leucocitarias y promoviendo la insulitis y posterior destrucción de las células beta, igual que ocurre en modelos transgénicos de otras citocinas proinflamatorias<sup>317</sup>. El IFN-beta a nivel local aumenta la expresión de MHC de clase I, juega un papel fundamental en la persistencia de las células T en el sitio de inflamación<sup>399</sup> y aumenta la producción de IL-2 por parte de estas, además favorece la expansión clonal y supervivencia de las células T CD8<sup>+400</sup>. Recientemente, se ha descrito que una de las acciones del IFN-beta es disminuir los niveles de TGF-beta<sup>401,402</sup> de forma que podría producirse una disminución de la población de células T reguladoras y/o un aumento en la activación de los linfocitos autoreactivos. Todos estos fenómenos estarían creando un microambiente inflamatorio en el que una rotura del equilibrio

podría llevar al ataque y destrucción de las células beta del páncreas. La caracterización del infiltrado en los modelos transgénicos mediante inmunofluorescencia indirecta demuestra que, similar a lo ya descrito en el modelo NOD<sup>73</sup>, está formado principalmente por células T y B. Se observan macrófagos y células dendríticas ocasionalmente. Los islotes de los animales transgénicos presentan una acentuada expresión de MHC de clase I, tanto si están infiltrados como si no. Este fenómeno se ha relacionado con las fases más tardías del desarrollo de la enfermedad, ya que los ratones NOD que carecen de expresión de MHC de clase I en las células beta por modificación genética, sí desarrollan insulinitis pero no diabetes<sup>403</sup>. Esto no ocurre en los controles no transgénicos NOD, en los que se observa que los islotes hiperexpresan MHC de clase I principalmente cuando están infiltrados. La expresión relativa de  $\beta_2$ -microglobulina a nivel de páncreas es superior en el grupo de animales transgénicos, lo que sugiere una expresión superior de MHC de clase I en este grupo y corrobora los datos inmunohistológicos de los páncreas de estos animales. La marcada expresión de MHC en las células endocrinas podría potenciar la presentación de autoantígenos a células T autoreactivas e iniciar el proceso autoinmune<sup>404</sup>. No se ha observado expresión de MHC de clase II en el tejido endocrino pero sí en los macrófagos y células dendríticas del infiltrado, datos que concuerdan con otros autores que en los islotes de NOD a cualquier edad sólo observan expresión de MHC de clase II en células CD45+<sup>405</sup>. Los animales NOD-SCID RIP-HuIFN-beta, aunque expresan MHC de clase I en los islotes como consecuencia de la expresión local de IFN-beta, al carecer de linfocitos T y B maduros, no desarrollan ni insulinitis ni diabetes.

La cuantificación de las subpoblaciones linfocitarias infiltrantes de páncreas indica que a nivel pancreático existe una disminución en los porcentajes de células B y un marcado aumento en los porcentajes de células NK en los animales transgénicos diabéticos NOD y NOR que desarrollan la enfermedad a edades muy tempranas (3-5 semanas de vida) respecto al resto de grupos estudiados, tanto sanos como diabéticos. En los animales NOD-RIP-HuIFN-beta diabéticos, esta correlación es estadísticamente significativa, hecho que no sucede en los ratones NOR-RIP-HuIFN-beta diabéticos, seguramente a causa de que la muestra analizada es menor. Se ha asociado el



aumento de células NK en el infiltrado pancreático a formas más agresivas de insulitis o insulitis destructiva<sup>129</sup> mientras que un mayor porcentaje de células B se ha relacionado con una insulitis que no progresa a diabetes clínica y se denomina insulitis benigna o no destructiva<sup>406</sup>. A las células NK se les ha adjudicado un papel protector o patogénico en diferentes modelos de enfermedades autoinmunes<sup>407</sup>. En un modelo murino de esclerosis múltiple la depleción de células NK agrava la enfermedad ya que incrementa la producción de citocinas de tipo Th1<sup>408</sup>. En cambio, en modelos animales de miastenia gravis y DT1 la eliminación de las células NK protege del desarrollo de la enfermedad<sup>129,409</sup>. Esta paradoja podría explicarse por diferencias funcionales en estas células en diferentes localizaciones anatómicas y por una regulación de su función que depende de citocinas estimuladoras y receptores activadores e inhibidores. Las células NK son eficientes productoras de IFN-gamma polarizando la respuesta hacia Th1, pero producen otros tipos de citocinas como IL-15, IL-10 e IL13 que inducen respuestas Th2 con un papel protector en autoinmunidad<sup>410</sup>. La activación de las células NK depende de múltiples interacciones receptor-ligando, incluyendo los ligandos inducidos por estrés<sup>411</sup>. La cuantificación de ligandos activadores de células NK a nivel insular no ha dado los resultados concluyentes para poder explicar la presencia de esa proporción elevada de NK en el infiltrado de los animales transgénicos diabéticos. Los ligandos seleccionados se unen al receptor activador NKG2D de las células NK, aunque este receptor también se encuentra en linfocitos CD8 y macrófagos activados<sup>412</sup>. Se ha demostrado que el bloqueo de este receptor previene la enfermedad en el ratón NOD<sup>413</sup>. La expresión de RAE-1 queda por debajo del límite de detección, H60 parece tener cierta tendencia a ser positivo en los animales transgénicos diabéticos y el recientemente descrito MULT-1<sup>414</sup> es el único que se detecta en la muestras de los animales diabéticos transgénicos pero no en el resto de grupos. La falta de detección de estas moléculas podría deberse a que en estos animales el tejido endocrino, que es dónde esperaríamos determinar su expresión, prácticamente ha desaparecido y este dato se ha confirmado mediante la detección de insulina con la misma técnica (datos no mostrados). Aunque se ha utilizado la técnica de LCM para recuperar el máximo de tejido y minimizar la dilución con otros tejidos, la observación de los islotes al microscopio evidenció un área muy

reducida para este tejido en el caso de los animales diabéticos, de forma que se decidió microdisecionar toda el área insular compuesta de endocrino e infiltrado. Otro de los receptores activadores en las células NK tanto de humano como de ratón, es el receptor de IFN de tipo I<sup>415</sup> por lo que las NKs podrían activarse a través de este receptor en nuestro modelo de estudio.

En los animales NOD transgénicos diabéticos no se han observado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de IFN-gamma a nivel insular respecto a sus homólogos diabéticos NOD. Seguramente esto es debido al número limitado de muestras analizadas ya que la expresión relativa de IFN-gamma es tres veces superior en los animales transgénicos diabéticos respecto sus controles NOD. Aunque en el modelo NOD ya se ha descrito una polarización de la respuesta hacia Th1<sup>416</sup>, este ligero aumento en los animales transgénicos diabéticos podría explicarse por el elevado número de células NK que se encuentran en el infiltrado, que podrían estar produciendo ellas mismas la citocina o induciendo la producción a otros tipos celulares como las células CD4.

El estudio realizado por Poirot *et al* en un modelo de diabetes autoinmune, determina que existe un aumento de la proporción de células NK en páncreas que acelera la diabetes<sup>129</sup> pero este aumento no se observa a nivel periférico en bazo, datos que concuerdan con los resultados de nuestro estudio. Estos autores establecen que las células NK son de los primeros tipos celulares en llegar al islote y no son atraídas por una inflamación ya establecida. Las células NK conectan las respuestas de la inmunidad innata con la inmunidad adaptativa optimizando la capacidad de los linfocitos CD8 citotóxicos<sup>417</sup> y polarizando hacia una respuesta Th1<sup>418</sup>. Diversos estudios relacionan la insulinitis benigna con un infiltrado tipo Th2 que se corresponde a las primeras fases de infiltración en el ratón NOD<sup>419</sup> y en la rata BB<sup>420</sup> y que en las últimas fases de prediabetes polariza hacia una respuesta Th1 en ambos modelos animales dando origen a la enfermedad clínica<sup>416,421,422</sup>. Se ha descrito que la administración de Poly I:C, un inductor de IFN-alfa, acelera el desarrollo de diabetes en la rata BB y aumenta el número de células NK<sup>423</sup>. En nuestro modelo transgénico, las células NK desempeñan un papel determinante en el desarrollo de la diabetes acelerada ya que la eliminación de estas células

mediante un anticuerpo específico de células NK, previene o retrasa el desarrollo de la enfermedad.

La transferencia adoptiva de esplenocitos o linfocitos infiltrantes de páncreas de animales transgénicos diabéticos de ambos fondos genéticos a animales inmunodeficientes, tanto NOD-SCID como NOD-SCID RIP-HuIFN-beta, implica en todos los casos el desarrollo de la enfermedad, lo que confirma el carácter autoinmune de la misma. La transferencia de esplenocitos de animales NOD RIP-HuIFN-beta diabéticos a NOD RIP-HuIFN-beta sanos implica un desarrollo de DT1 muy agudo en animales que mantienen una insulinitis benigna que no avanza a diabetes clínica. Diferentes evidencias apuntan a que el desarrollo de la enfermedad en estos modelos transgénicos, que expresan HuIFN-beta en las células beta pancreáticas, se produce por un mecanismo de autoinmunidad: a) los islotes de los animales transgénicos hiperexpresan MHC de clase I, b) los islotes están infiltrados por linfocitos T y B, c) la transferencia de linfocitos de animales transgénicos diabéticos implica el desarrollo de la enfermedad a animales inmunodeficientes y la aceleración de la misma a animales en estado prediabético y d) los animales NOD-SCID RIP-HuIFN-beta transgénicos inmunodeficientes no desarrollan insulinitis ni diabetes, debido a la carencia de linfocitos T y B maduros.

Dado que el HuIFN-beta se detecta a nivel sistémico y tiene funciones inmunomoduladoras, se han analizado los porcentajes relativos de diferentes subpoblaciones de linfocitos a nivel local pancreático y a nivel periférico. Se ha observado que la expresión del transgén y el desarrollo de diabetes van asociados a alteraciones en las proporciones de poblaciones linfocitarias en periferia en los animales transgénicos diabéticos. A nivel esplénico, que se ha señalado como el mayor reservorio de linfocitos T autoreactivos frente a célula beta<sup>424</sup>, se ha descrito un aumento de las proporciones de linfocitos T en las cepas NOD y NOR respecto al modelo resistente a diabetes C57BL/6J<sup>355</sup>. La expresión de HuIFN-beta no implica variaciones en los porcentajes de las subpoblaciones esplénicas entre animales transgénicos sanos y sus cepas originales control. En los animales transgénicos diabéticos se observa una disminución de linfocitos CD8 a nivel esplénico respecto a los controles transgénicos sanos, esta población podría haber disminuido por desplazamiento a otros nichos o porque la población de linfocitos B estuviese

aumentada en los bazos de estos animales. Existen diferencias significativas y una correlación inversa entre las proporciones de linfocitos B y células NK entre las dos cepas transgénicas en estado diabético. Los animales NOR RIP-HuIFN-beta diabéticos presentan unos porcentajes de linfocitos B superiores y de células NK inferiores a los ratones NOD RIP-HuIFN-beta diabéticos a nivel esplénico. En general, los animales en fondo genético NOD muestran una proporción de células NKT periféricas, tanto a nivel esplénico como de ganglio regional pancreático, inferiores al resto de cepas como ya se ha descrito previamente<sup>425,426</sup> y que se ha correlacionado con un aumento de esta población en médula ósea, lo que sugiere algún defecto en los mecanismos de exportación de esta población de este tejido. En los animales NOR RIP-HuIFN-beta diabéticos, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas con sus controles transgénicos sanos, la proporción de células NKT disminuye un 40% respecto a los animales sanos y se asemeja más a los porcentajes que se encuentran en los grupos en *background* genético NOD. Dado que el ganglio regional pancreático es el lugar donde se produce el *priming* inicial de las células T autoreactivas frente a célula beta<sup>427</sup>, la baja proporción de células NKT, que actúan como reguladoras induciendo anergia en las células T autoreactivas<sup>19</sup>, facilitaría el proceso autoinmune mediado por estas células autoreactivas. En la rata BB también se ha publicado una deficiencia en la población periférica de células NKT que se ha relacionado con su susceptibilidad a la enfermedad<sup>428</sup>. En humanos se ha descrito en general una disminución en la población de NKT en enfermos de diabetes tipo 1<sup>17</sup> y en particular, una disminución en la frecuencia y función de esta población en los individuos diabéticos de parejas de gemelos idénticos<sup>429</sup>. Se ha demostrado que la transferencia de células NKT a animales NOD prediabéticos, previene el desarrollo de la enfermedad<sup>430</sup>, hecho que apoya la capacidad inmunoreguladora de este tipo celular en el desarrollo de DT1.

Es sabido que la diabetes que desarrolla el modelo NOD es claramente de origen autoinmune: a) se aíslan células autoreactivas del páncreas de los animales diabéticos, b) se asocian otras enfermedades autoinmunes a la misma cepa, c) existe una infiltración linfocitaria del órgano diana formada principalmente por células T, d) la enfermedad se relaciona con un determinado haplotipo de MHC, en el caso del NOD H-2<sup>g7</sup> y d) existe una respuesta

favorable a la inmunosupresión<sup>431</sup>. Las transferencias adoptivas de la enfermedad demuestran que la diabetes que desarrolla este modelo transgénico está mediada por linfocitos. La transferencia de esplenocitos o linfocitos infiltrantes de páncreas de animales transgénicos diabéticos a ratones inmunodeficientes implica el desarrollo de la enfermedad, que está mediada por células T. Los animales SCID carecen de células T o B maduras, pero sí que tienen células NK y APCs. Los ratones NOD-SCID RIP-HuIFN-beta que son inmunodeficientes pero expresan HuIFN-beta en las células beta pancreáticas no desarrollan de forma natural ni insulinitis ni diabetes, pero sí cuando se les transfieren células diabetogénicas derivadas de animales NOD-RIP-HuIFN-beta diabéticos, lo que sugiere que el estímulo inflamatorio producido por el IFN-beta de forma local no es suficiente para el desarrollo de la enfermedad en ausencia de células T y B maduras. La transferencia de linfocitos diabetogénicos a animales NOD-RIP-HuIFN-beta en fase prediabética implica un desarrollo de la enfermedad de forma muy aguda, de forma que el equilibrio en la insulinitis benigna que mantienen estos animales se rompe en favor de la infiltración destructiva y como consecuencia, el desarrollo de la enfermedad clínica. En cambio, la transferencia de esplenocitos de la cepa NOR a animales NOD-SCID no implica el desarrollo de la enfermedad, lo que demuestra que el balance entre células autoreactivas y células reguladoras es determinante para el desarrollo de la enfermedad, ya que los animales NOR muestran un porcentaje de células NKT a nivel esplénico superior estadísticamente a los animales diabéticos. En experimentos de transferencia de células marcadas con CFSE (datos no mostrados), determinamos que las células inyectadas vía intravenosa son capaces de llegar a páncreas en 24 horas. Esto sugiere que en animales previamente infiltrados, las células autoreactivas que llegan al páncreas podrían acelerar el proceso ya establecido, mientras que en animales no infiltrados es necesaria la expansión de estas células transferidas de forma que el proceso de infiltración se establece de forma más fisiológica y por tanto más lenta. Esto explicaría por qué en los receptores NOD-SCID RIP-HuIFN-beta no se observa una aceleración de la infiltración mediada por la expresión local de IFN tras la transferencia de linfocitos diabetogénicos.

Los modelos transgénicos clásicos expresan el producto del transgén desde la etapa embrionaria. En nuestro caso, el transgén se expresa bajo el promotor de la insulina, que se ha demostrado que se expresa a nivel tímico<sup>8,12</sup> y además, se ha determinado la presencia de HuIFN-beta a nivel sistémico. Teniendo en cuenta estos datos, podría darse la situación de expresión de IFN-beta humano a nivel tímico que causara una situación pro-inflamatoria local (con hiperexpresión de MHC de clase I), durante la que se alterara la selección de los linfocitos T de los animales transgénicos respecto a los controles, afectando a la tolerancia central y a la posterior incidencia de autoinmunidad. Sin embargo, aunque sí que se ha observado la expresión de bajos niveles de IFN-beta humano a nivel tímico en animales jóvenes y sanos -siendo la expresión de IFN aproximadamente 100 veces menor que la de insulina 2-, la expresión de clase I y otros autoantígenos en timo no muestran alteraciones, con lo cual, hipotetizamos que no hay diferencias a nivel de tolerancia central porque no se detecta un aumento en la expresión de MHC de clase I en timo.

¿De qué forma podría la expresión de IFN-beta por las células productoras de insulina desencadenar una respuesta autoinmune? En 1994 Polly Matzinger propuso el modelo inmunológico de las señales de peligro en el que se postula que el objetivo del sistema inmune es proteger al organismo del daño *per se* y no lo solamente de lo externo<sup>432</sup>. El inicio de la respuesta inmune puede ser inducida por señales de peligro endógenas -moléculas o estructuras moleculares liberadas o producidas por células en tejidos sometidos a estrés, daño tisular o muerte celular anormal- o exógenas, elaboradas por patógenos<sup>433</sup>. Algunas señales de peligro endógenas descritas incluyen *heat-shock proteins*, nucleótidos, productos intermedios del oxígeno reactivo, productos derivados de la rotura de la matriz extracelular, neuromediadores y algunas citocinas, como los IFN de tipo I. Las señales de peligro inducibles, se generan tras un estrés o daño celular. En este grupo se clasifican los IFN de tipo I, que se secretan tras un infección vírica y existen evidencias directas e indirectas que actúan como señales de peligro. En nuestro modelo transgénico se ha analizado la expresión relativa de TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 y TLR9, estos receptores (junto con TLR8) se han asociado a una respuesta inmune inducida por virus<sup>434</sup>. En animales sanos o prediabéticos se ha determinado la expresión de estos receptores en tejido endocrino mientras que en los animales

diabéticos la muestra ha sido todo el material insular, incluyendo endocrino e infiltrado. Se ha publicado la expresión de TLR2, TLR3, TLR4 y TLR9 en islotes de ratones sanos de diferentes cepas, sin diferencias entre ellas, incluyendo NOD y NOR<sup>435</sup>. En islotes humanos es TLR3 el que presenta una expresión superior. Se ha descrito que la expresión de estos receptores se incrementa cuando se unen a su ligando natural. Se sabe que cada uno de los 13 TLRs identificados hasta la fecha en mamíferos<sup>436</sup>, reconocen diferentes patrones moleculares como RNA, DNA o LPS y el perfil de citocinas producido dependerá del tipo de TLR. Diferentes estímulos endógenos (por ejemplo, material derivado de células necróticas) pueden actuar como ligandos de TLRs y activar diferentes respuestas inmunes<sup>437</sup> en función del tipo de células que expresen los TLR y la localización anatómica donde se encuentren. Dado que en nuestro modelo no se induce una infección con patógenos, los animales están en condiciones SPF, ni se administran agonistas ligandos de TLRs, cabe pensar que es un estímulo endógeno el que podría activar los TLRs y aumentar su expresión. En todos TLRs analizados en nuestro estudio, los animales NOD RIP-HuIFN-beta diabéticos presentan una expresión significativamente superior a los animales NOD diabéticos, particularmente TLR7 y TLR9 que señalizan por la misma vía para la producción de citocinas proinflamatorias<sup>438</sup>. En un modelo de diabetes inducida por virus, se ha descrito que a través de la estimulación de TLR-3 y TLR-7, se induce la hiperexpresión de MHC de clase I en las células beta pancreáticas (inducida por la producción de IFN) y se activan los linfocitos T CD8 autoreactivos promoviendo de esta manera la autoinmunidad<sup>439</sup>. Aunque se ha demostrado su expresión en otras células, los TLR se expresan principalmente en APC profesionales donde la unión al ligando adecuado conduce a la producción de citocinas, quimiocinas moléculas coestimuladoras y juegan un papel muy importante uniendo la inmunidad innata con la adaptativa promoviendo una respuesta Th1<sup>440,441</sup>. En células NK humanas se ha descrito la presencia de TLRs, entre ellos TLR9 de forma que la activación de estos receptores sirve para amplificar la respuesta efectora de este tipo celular<sup>415</sup>. Como en las muestras de animales diabéticos se incluye el infiltrado esta expresión podría detectarse en las APCs incluidas en la insulitis o en otros tipos celulares del infiltrado. Se ha demostrado que la secreción de IFN de tipo I derivada de una infección viral puede aumentar la expresión de

TLR1, TLR2, TLR3 y TLR7 en macrófagos y es un efecto directo ya que la adición de anticuerpos bloqueantes de IFN-alfa/beta disminuye esta expresión<sup>442</sup>. Se ha sugerido que las células del sistema inmune podrían reconocer una invasión viral a través de TLR3, TLR4, TLR7 y TLR9 mediante productos virales o las moléculas que se secretan en función a una respuesta viral<sup>438</sup>. Uno de estas moléculas podría ser el IFN-beta que se ha demostrado que en el caso concreto de TLR3 y TLR4 sirve para regular positivamente la expresión de estos receptores<sup>2,443</sup>. En moscas y mamíferos se ha demostrado que los miembros de la familia TLR responden a estímulos endógenos y exógenos, un mismo TLR puede reconocer señales de peligro endógenas y exógenas. El modelo de señales de peligro sugiere que la enfermedades autoinmunes estarían causadas por mutaciones en genes encargados de la muerte y eliminación celular fisiológica normal o por patógenos o toxinas que causen estrés o muerte celular<sup>444</sup>.

Los resultados presentados en este trabajo, junto con estudios previos y futuros, pueden ayudar a entender cómo la producción de IFNs de tipo I en el páncreas afecta al reclutamiento de células infiltrantes y acelera el inicio de la diabetes clínica. Nuestros datos indican que la expresión de la citocina antiviral IFN-beta por las células productoras de insulina, provoca la rotura de la tolerancia periférica dando lugar a insulitis y autoinmunidad en animales susceptibles y no susceptibles a la enfermedad. En este modelo transgénico la enfermedad está mediada por linfocitos ya que la carencia de células T y B maduras impiden el desarrollo de insulitis y posterior diabetes aunque exista un aumento de la expresión de MHC de clase I a nivel insular. Estos datos, apoyan indirectamente el posible papel de los virus en la etiología de la DT1, como causantes de una situación inflamatoria mediada inicialmente por IFNs de tipo 1 en la que las células del sistema inmune reconocen 'señales de peligro' de un tejido atacado, lo que puede desembocar en un proceso autoinmune que varía en función del background genético del individuo.



## CONCLUSIONES

1. La expresión de la citocina antiviral IFN-beta por parte de las células beta pancreáticas acelera la DT1 en el modelo murino NOD y rompe la tolerancia a las células beta en ratones genéticamente resistentes a la enfermedad portadores de un alelo de MHC de susceptibilidad (NOR).
2. El *background* genético determina el momento de inicio clínico y la incidencia de la enfermedad en los ratones transgénicos RIP-HuIFN-beta.
3. La diabetes causada o acelerada por la expresión de IFN-beta es de etiología autoinmune y no está causada por una disfunción metabólica de la célula beta debida a la expresión de transgén.
4. La expresión del IFN-beta por parte de las células productoras de insulina implica una marcada inflamación insular. Sin embargo, su débil expresión en timo no afecta al microambiente tímico ya que la expresión de hormonas insulares y de beta-2-microglobulina es normal.
5. Las células NK tienen un papel determinante en la aceleración de la diabetes mediada por la expresión local de IFN-beta.
6. La expresión de IFN-beta en los islotes -señal de peligro endógena- incrementa la expresión de TLRs asociados a una respuesta antiviral.
7. La expresión local de IFN-beta implica cambios morfológicos en los islotes en forma de un aumento en el tamaño de los mismos debido a un incremento en el número celular.
8. El IFN-beta secretado por las células beta pancreáticas se detecta a nivel sistémico, lo que se asocia a variaciones en las subpoblaciones linfocitarias esplénicas pero no en las de ganglio regional pancreático en animales diabéticos transgénicos.



## BIBLIOGRAFÍA RESULTANTE DE LA ETAPA PREDOCTORAL

### ARTÍCULOS ORIGINALES

1. A. Luna , JF. Julián, **A. Alba**, F. Garcia-Cuyás, MA. Broggi, G. Ciancio, R. Pujol-Borrell, J. Fdez-Llamazares, M. Vives-Pi. **Syngeneic islet transplantation into seminal vesicles of diabetic rats.** *J Invest Surg* 18:13-18, 2005
2. J. Carrillo, MC. Puertas, **A. Alba**, RM. Ampudia, X. Pastor, R. Planas, N. Riutort, N. Alonso, R. Pujol-Borrell, P. Santamaria, M. Vives-Pi, J. Verdaguer. **Islet infiltrating B lymphocytes in non-obese diabetic mice predominantly target nervous system elements.** *Diabetes* 54:69-77, 2005
3. **A. Alba**, MC. Puertas, J. Carrillo, R. Planas, R. Ampudia, X. Pastor, F. Bosch, R. Pujol-Borrell, J. Verdaguer, M. Vives-Pi. **IFN- $\beta$  accelerates autoimmune type 1 diabetes in NOD mice and breaks the tolerance to  $\beta$ -cells in non-diabetes prone mice.** *J Immunol* 173:6667-6675, 2004
4. M. Vives-Pi, N. Somoza, J. Fernández, F. Vargas, P. Caro, **A. Alba**, R. Gomis, M.O. Labeta, R. Pujol-Borrell. **CD14 and toll like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 confer endotoxin (LPS) sensitivity to islet beta cells.** *Clin Exp Immunol* 133:208-218, 2003
5. A. Luna, J.F. Julián, **A. Alba**, R. Colobrán, F. García-Cuyàs, M.T. Fernández-Figueras, M.A. Broggi, J.F. Llamazares, R. Pujol-Borrell, M. Vives-Pi. **Islet Transplantation in seminal vesicles restores glycemia in diabetic rats: a preliminary study.** *Transpl Proc* 34:196-199, 2002

## REVISIONES

1. **A. Alba**, R. Planas, J. Verdaguer, M Vives-Pi. **Viral infections and autoimmune diabetes.** *Inmunología* 24:33-43, 2005
2. **A. Alba**, M. Vives-Pi, M. Juan. **Avances en inmunología de la diabetes tipo 1: IDS7-2004, Cambridge (UK).** (*Advances in immunology of type 1 diabetes: IDS7-2004, Cambridge (UK).* *Inmunología* 23:243-247, 2004
3. **A. Alba**, J. Verdaguer, M. Vives-Pi. **Diabetes tipo 1: autoinmunidad frente a la célula beta.** (*Type 1 diabetes: autoimmunity against beta cell*) *Endocrinol Nutr* 51:121-125, 2004

## REFERENCIAS

---

- <sup>1</sup> Day MJ. Basic Immunology. En *Clinical Immunology of the dog and cat*. pp 9-46. Iowa State University Press, Iowa, 1999
- <sup>2</sup> Vaidya SA, Cheng Genhong. Toll-like receptors and innate antiviral responses. *Curr Opin Immunol* 15:402-407, 2003
- <sup>3</sup> Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. 3ª edición, Masson, Barcelona, 2003
- <sup>4</sup> Tussey LG, McMichael AJ. General introduction to the MHC. En *Modulation of MHC antigen expression and disease*. pp 1-26, Cambridge University Press, Cambridge, 1995
- <sup>5</sup> Goodfellow P N, Jones E A, Van Heyningen V, Solomon E, Bobrow M. The beta-2-microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HL-A region. *Nature* 254: 267-269, 1975
- <sup>6</sup> Cox DR, Sawicki JA, Yee D, Appella E, Epstein CJ. Assignment of the gene for beta 2-microglobulin (B2m) to mouse chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 1930–1934, 1982
- <sup>7</sup> Harber M, Sundstedt A, Wraith D. The role of cytokines in immunological tolerance: potential for therapy. *Exp Rev Mol Med*, 2000  
<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/00002143h.htm>
- <sup>8</sup> Pugliese A. Central and peripheral autoantigen presentation in immune tolerance. *Immunology* 111:138-146, 2004
- <sup>9</sup> Goodnow CC. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proc Natl Sci USA* 93:2264-2271, 1996

- 
- <sup>10</sup> Martini A, Burgio GR. Tolerance and autoimmunity: 50 years after Burnet. *Eur J Pediatr* 158:769-775, 1999
- <sup>11</sup> Sprent J, Kishimoto H. The thymus and central tolerance. *Phil Trans R Soc Lond B* 356:609-616, 2001
- <sup>12</sup> Pugliese A, Brown D, Garza D, Murchison D, Zeller M, Redondo M, Diez J, Eisenbarth GS, Patel DD, Ricordi C. Self-antigen-presenting cells expressing diabetes-associated autoantigens exists both in thymus and peripheral lymphoid organs. *J Clin Invest* 107:555-564, 2001
- <sup>13</sup> Klein L, Kyewski B. 'Promiscuous' expresión of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity? *J Mol Med* 78:483-494, 2000
- <sup>14</sup> Homann D, von Herrath M. Regulatory T cells and Type 1 diabetes. *Clin Immunol* 112:202-209, 2004
- <sup>15</sup> Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. Organ specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 161:72-87, 1985
- <sup>16</sup> von Herrath M, Harrison LC. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 3:223-232, 2003
- <sup>17</sup> 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* 112:131-140, 2002
- <sup>18</sup> Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2:557-568, 2002

- 
- <sup>19</sup> Hammond KJ, Kronenberg M. Natural killer T cells: natural or unnatural regulators of autoimmunity? *Curr Opin Immunol* 15:683-689, 2003
- <sup>20</sup> Mackay IR. The 'Autoimmune diseases' 40th anniversary. *Autoimmunity Reviews* 1:5-11, 2002
- <sup>21</sup> Anderson MS. Autoimmune endocrine disease. *Curr Opin Immunol* 14:760-764, 2002
- <sup>22</sup> Feltkamp TEW. The mystery of autoimmune diseases. En *The decade of autoimmunity*, pp 1-5. Elsevier, Amsterdam, 1999
- <sup>23</sup> Rose NR. Autoimmunity at a turning point: from investigation to intervention. *Autoimmunity Reviews* 1:3-4, 2002
- <sup>24</sup> Cooper GS, Stroehla BC. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* 2:119-125, 2003
- <sup>25</sup> Walsh SJ, Rau LM. Autoimmune diseases: a leading cause of death among young and middle-aged women in the United States. *Am J Public Health* 90:1463-6, 2000
- <sup>26</sup> Beeson, P. B. Age and sex associations of 40 autoimmune diseases. *Am J Med* 96:457-462, 1994
- <sup>27</sup> Whitacre C C. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2:777-780, 2001
- <sup>28</sup> Witebsky E, Rose NR, Terplan K, Paine JR, Egan RW. Chronic thyroiditis and autoimmunization. *J Am Med Assoc* 164:1439-1447, 1957
- <sup>29</sup> Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunology Today* 14:426-430, 1993

- 
- <sup>30</sup> Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 345:340-350, 2001
- <sup>31</sup> Pugliese A, Gianani R, Moromisato R, Awdeh ZL, Alper CA, Erlich HA et al. HLA-DQB1\*0602 is associated with dominant protection from diabetes even among islet cell antibody-positive first degree relatives of patients with IDDM. *Diabetes* 44:608-613, 1995
- <sup>32</sup> Barcelos LF, Oksenberg JR, Begovich AB, Martin ER, Schmidt S, Vittinghoff E et al. HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. *Am J Hum Genet* 72:710-716, 2003
- <sup>33</sup> Olmos P, A'Hearn R, Heaton DA, Millward BA, Risley D, Pyke DA et al. The significance of the concordance rate of type I (insulin-dependent) diabetes mellitus in identical twins. *Diabetologia* 31:747-750, 1988
- <sup>34</sup> Redondo MJ, Yu L, Hawa M, Mckenzie T, Pyke DA, Eisenbarth GS et al. Heterogeneity of type 1 diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. *Diabetologia* 44:354-362, 2001
- <sup>35</sup> Wandstrat A, Wakeland E. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol* 2:802-809, 2001
- <sup>36</sup> Abu-Shakra M, Shoenfeld Y. Parasitic infection and autoimmunity. En *Infection and Autoimmunity*, pp 439-448. Elsevier BV, Amsterdam, 2004
- <sup>37</sup> Karvonen M, Viik-kajander M, Moltchanova E, Libman I, Laporte R, Tuomilehto J. Incidence of childhood type 1 diabetes Worldwide. Diabetes Mondiale (DiaMond) Project Group. *Diabetes Care* 23:1516–1526, 2000



- 
- <sup>38</sup> Karam JH. Pancreatic hormones and diabetes mellitus. En *Basic and Clinical Endocrinology*. pp 595-608, Fifth Edition, Appleton and Lange, Maidenhead, 1997
- <sup>39</sup> Weir GC, Bonner-Weir S. Islets of Langerhans: The Puzzle of intraislets interactions and their relevance to diabetes. *J Clin Invest* 85:983-987, 1990
- <sup>40</sup> Slack JMW. Developmental biology of the pancreas. *Development* 121:1569-1580, 1995
- <sup>41</sup> Ahren B. Autonomic regulation of islet hormone secretion. Implications for health and disease. *Diabetologia* 43:393-410, 2000
- <sup>42</sup> Salvioli B, Bovara M, Barbara G, De Ponti F, Stanghellini V, Tonini M, Guerrini S, Cremon C, Degli Esposti M, Koumandou M, Corinaldesi R, Sternini C, De Giorgio R. Neurology and neuropathology of the pancreatic innervation. *J Pancreas* 3:26-33, 2002
- <sup>43</sup> Paronen J, Moriyama H, Abiru N, Sikora K, Melatinou E, babu S, Bao F, Liu E, Miao D, Eisenbarth GS. Establishing insulin 1 and insulin 2 knockout congenic strains on NOD genetic background. *Ann NY Acad Sci* 1005:205-210, 2003
- <sup>44</sup> Soler J, Raurell M, Nacher V. Síntesi i secreció d'insulina. En *Diabetes Mellitus*, pp 57-68, Associació Catalana de Diabetes, Barcelona, 1996
- <sup>45</sup> Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO consultation, 1999
- <sup>46</sup> Fui SNT, Keen H. Criterios diagnósticos, clasificación y presentación de la diabetes. En *Diabetes Clínica-I. Texto Ilustrado*. pp 6.1-6.14, Ancora, Barcelona, 1990

- 
- <sup>47</sup> The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 25 (suppl 1):S5-S20, 2002
- <sup>48</sup> Wucherpfennig KW, Eisenbarth GS. Type 1 Diabetes. *Nat Immunol* 2:1-3, 2001
- <sup>49</sup> Vitoria JC, Castaño L, Rica I, Bilbao JR, Arrieta A, Garcia-Masdevall MD. Association of insulin-dependent diabetes mellitus and celiac disease: a study based on serologic markers. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 27:47-52, 1998
- <sup>50</sup> Pozzilli P, Di Mario U. Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (Latent Autoimmune Diabetes of the Adult). *Diabetes Care* 24:1460-1467, 2001
- <sup>51</sup> Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047–1053, 2004
- <sup>52</sup> Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z, Inzucchi S, Dresner A, Rothman DL, Shulman GI. Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogenesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 341:240–246, 1999
- <sup>53</sup> Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action. Implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* 341:248-253, 1999
- <sup>54</sup> Leahy JL. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch Med Res* 36:197–209, 2005
- <sup>55</sup> O'Sullivan JB. Diabetes alter GDM. *Diabetes* 40 (Suppl. 2):131-135, 1991
- <sup>56</sup> American Diabetes Association. Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 26:S103-S105, 2003

- 
- <sup>57</sup> LaPorte RE, Tuomilehto J, King H. WHO Multinational Project for Childhood Diabetes. *Diabetes Care* 13:1062-1068, 1990
- <sup>58</sup> Diabetes Epidemiology Research International Group: Geographic patterns of childhood insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 37:1113-1119, 1988
- <sup>59</sup> Karvonen M, Pitkaniemi M, Kohtamaki K, Tajima N, Tuomilehto J for the World Health Organization DIAMOND Project Group. Sex difference in the incidence of insulin-dependent diabetes mellitus: an analysis of the recent epidemiological data. *Diabetes Metab Rev* 13:275-291, 1997
- <sup>60</sup> Onkamo P, Väänänen S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of type 1 diabetes: the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia* 12:1395-1403, 1999
- <sup>61</sup> Åkerblom HK, Knip M. Putative environmental factors in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Rev* 14:31-67, 1998
- <sup>62</sup> Clonen J, Sjöroos M, Knip M, Veijola R, Simell O, Akerblom HK, Paschou P, Bozas E, Havarini B, Malamitsi-Puchner A, Thymelli J, Vazeou A, Bartsocas CS. Estimation of genetic risk for type 1 diabetes. *Am J. Med Genet* 115:30-36, 2002
- <sup>63</sup> Wicker LS, Miller BJ, Coker LZ, McNally SE, Scott S, Mullen Y et al. Genetic control of diabetes and insulinitis in the nonobese diabetic (NOD) mouse. *J Exp Med* 165:1639-1654, 1987
- <sup>64</sup> Graham J, Kockum I, Sanjeevi CB, Landin-Olsson M, Mystrom L, Sundkvist G, et al. Negative association between type 1 diabetes and HLA DQA1\*0102-B1\*0602 is attenuated with age at onset. Swedish Childhood Diabetes Study Group. *Eur J Immunogenet* 26:117-127, 1999

- 
- <sup>65</sup> Schmidt D, Verdaguer J, Averill N, Santamaria P. A mechanism for the major histocompatibility complex-linked resistance to autoimmunity. *J Exp Med* 186:1059-1075, 1997
- <sup>66</sup> Lee KH, Wucherpfennig KW, Wiley DC. Structure of a human insulin peptide/HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes. *Nat Immunol* 2:501-507, 2001
- <sup>67</sup> Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQB gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 329:599-604, 1987
- <sup>68</sup> Acha-Orbea H, McDevitt HO. The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A chain is unique. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2435-2439, 1987
- <sup>69</sup> Wicker LS, Todd JA, Peterson LB. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu. Rev Immunol* 13:179-200, 1995
- <sup>70</sup> Pociot F. Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes Immun* 3:235-249, 2002
- <sup>71</sup> Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, MacMurray J, Meloni GF, Lucarelli P, Pellecchia M, Eisenbarth GS, Comings D, Mustelin T. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 36:337-8, 2004
- <sup>72</sup> Guo D, et al. A functional variant of SUMO4, a new I $\kappa$ B $\alpha$  modifier, is associated with type 1 diabetes. *Nat Genet* 36:337-338, 2004
- <sup>73</sup> Eisenbarth GS. Animal models of type 1 diabetes: genetics and immunological function. En Type 1 diabetes: Molecular, Cellular and clinical immunology. Online Edition version 2.5, <http://www.uchsc.edu/misc/diabetes/eisenbook.html>

- 
- <sup>74</sup> Kumar D, Gemayel NS, Deapan D et al. North American twins with type 1 diabetes. Genetic, etiological and clinical significance of disease concordance according to age, zygosity, and the interval after diagnosis of the first twin. *Diabetes* 42:1351-63, 1993
- <sup>75</sup> Fava D, Leslie RDG, and Pozzilli P: Relationship between dairy product consumption and incidence of IDDM in childhood in Italy. *Diabetes Care* 17: 1488–1490, 1994.
- <sup>76</sup> Virtanen SM, Rasanen L, Ylonen K, Aro A, Clayton D, Langholz B, Pitkaniemi J, Savilahti E, Lounamaa R, Tuomilehto J, Åkerblom HK, and the “Childhood Diabetes in Finland” Study Group: Early introduction of dairy products associated with increased risk for insulin-dependent diabetes mellitus in Finnish children. *Diabetes* 42: 1786–1790, 1993.
- <sup>77</sup> Knip M. Environmental triggers and determinants of beta-cell autoimmunity and type 1 diabetes. *Reviews in Endocrine and Metabolic disorders* 4:213-223, 2003
- <sup>78</sup> Saukkonen T, Savilahti E, Vaarala O, Virtala ET, Tuomilehto J, Akerblom HK, The Childhood Diabetes in Finland Study Group. Children with newly diagnosed IDDM have increased levels of antibodies to bovine serum albumin but not to ovalbumin. *Diabetes Care* 17:970–976, 1994
- <sup>79</sup> Elliott RB, and Martin JM: Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB rat? *Diabetologia* 26: 297–299, 1984.
- <sup>80</sup> Coleman DL, Kuzava JE, and Leiter EH: Effect of diet on incidence of diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 39: 432–436, 1990.

- 
- <sup>81</sup> Ziegler AG, Hummel M, Schenker M, Bonifacio E. Autoantibody appearance and risk for the development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the German BABY-DIAB Study. *Diabetes* 48:460-468, 1999
- <sup>82</sup> Ziegler AG, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA* 290:1721-1728, 2003
- <sup>83</sup> Klemetti P, Savilahti E, Ilonen J, Åkerblom HK, Vaarala O. T cell reactivity to wheat gluten in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Scand J Immunol* 47: 48–53, 1998
- <sup>84</sup> Savilahti E, Simell O, Koskimies S, Rilva A, and Åkerblom HK. Celiac disease in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Pediatr* 108: 690–693, 1986.
- <sup>85</sup> Elliott RB. Dietary prospects of prevention of type I diabetes. *Diabetes Nutr Metab* 2: 67–71, 1989
- <sup>86</sup> Virtanen SM, Räsänen L, Aro A, Ylönen K, Lounamaa R, Akerblom HK, Tuomilehto J, and the “Childhood Diabetes in Finland” Study Group: Is children’s or parents’ coffee or tea consumption associated with the risk for Type 1 diabetes mellitus in children? *Eur J Clin Nutr* 48: 279–285, 1994
- <sup>87</sup> Tobia MH, Zdanowicz MM, Wingertzahn, McHeffey-Atkinson B, Slonim AE, Wapnir RA. *Mol Genet Metab* 63:205-213, 1998
- <sup>88</sup> Zhao HX, Mold MD, Stenhouse EA, Bird SC, Wright DE, Demaine AG, Millward BA. Drinking water composition and childhood-onset type 1 diabetes mellitus in Devon and Cornwall, England. *Diabet Med* 18:709-717, 2001
- <sup>89</sup> Haglund B, Ryckenberg K, Selinus O, and Dahlquist G: Evidence of a relationship between childhood-onset Type 1 diabetes and low groundwater concentration of zinc. *Diabetes Care* 19: 873–875, 1996

- 
- <sup>90</sup> Mathieu C, Waer M, Laureys J, Rutgeerts O, Nouillon R. Prevention of type 1 diabetes in NOD mice by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Diabetologia* 37:552-558, 1994
- <sup>91</sup> The EURODIAB substudy 2 Study Group. Vitamin D supplement in early childhood and risk of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 42:51-54, 1999
- <sup>92</sup> Dahlquist G, Blom L, and Lönnberg G: The Swedish Childhood Diabetes Study: a multivariate analysis of risk determinants for diabetes in different age groups. *Diabetologia* 34: 757–762, 1991
- <sup>93</sup> Wilberz S, Partke HJ, Dagnaes-Hansen F, Herberg L. Persistent MHV (mouse hepatitis virus) infection reduces the incidence of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 34:2-5, 1991
- <sup>94</sup> Like AA, Guberski DL, and Butler L. Influence of environmental viral agents on frequency and tempo of diabetes mellitus in BB/Wor rats. *Diabetes* 40:259–262, 1991
- <sup>95</sup> Kolb H, and Elliott RB: Increasing incidence of IDDM a consequence of improved hygiene? *Diabetologia* 37: 729, 1994 (Letter)
- <sup>96</sup> Quintana FJ, Cohen IR. Type 1 diabetes mellitus, infection and toll-like receptors. En *Infection and Autoimmunity*, pp 505-513. Elsevier BV, Amsterdam, 2004
- <sup>97</sup> Cooke A, Zaccane P, Raine T, Phillips JM, Dunne DW. Infection and autoimmunity: are we winning the war, only to lose the peace? *Trends Parasitol* 20:316-321, 2004

---

<sup>98</sup> Alba A, Vives-Pi M, Juan M. Avances en inmunología de la diabetes tipo 1: IDS7-2004, Cambridge (UK) *Inmunología* 23:243-247, 2004

<sup>99</sup> Aron-Maor A, Shoenfeld Y. Vaccination and Autoimmunity. En *Infection and Autoimmunity*, pp 105-116. Elsevier BV, Amsterdam, 2004

<sup>100</sup> Classen JB, Classen DC. Association between type 1 diabetes and Hib vaccine: causal relation is likely. *BMJ* 319:1133, 1999

<sup>101</sup> DeStefano F, Mullooly JP, Okro CA. Childhood vaccinations, vaccination timing and risk of type I diabetes mellitus. *Paediatrics* 108:E112, 2001

<sup>102</sup> Blom L, Nyström L, and Dahlquist G: The Swedish childhood diabetes study: vaccinations and infections as risk determinants for diabetes in childhood. *Diabetologia* 34: 176–181, 1991

<sup>103</sup> Dahlquist G, Ivarsson S, Lindberg B, and Forsgren M: Maternal enteroviral infection during pregnancy. *Diabetes* 44: 408–413, 1995.

<sup>104</sup> Dahlquist G, and Källen B: Maternal–child blood group incompatibility and other perinatal events increase the risk for early-onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 35: 671–675, 1992.

<sup>105</sup> Myers MA, Mackay IR, Rowley MJ, Zimmet PZ. Dietary microbial toxins and type 1 diabetes -a new meaning for seed and soil. *Diabetologia* 37:552-558, 1994

<sup>106</sup> Kostraba JN, Gay EC, Rewers M, and Hamman F: Nitrate levels in community drinking waters and risk of IDDM. *Diabetes Care* 15: 1505–1508, 1992.

<sup>107</sup> Virtanen SM, Jaakkola L, Räsänen L, Ylönen K, Aro A, Lounamaa R, Åkerblom HK, Tuomilehto J, and The Childhood Diabetes in Finland (DiMe)



---

Study Group: Nitrate and nitrite intake and the risk for Type 1 diabetes in Finnish children. *Diabetic Med* 11: 656–662, 1994.

<sup>108</sup> Vialettes B, Ozanon JP, Kaplansky S, Farnarter C, Sanvaget E, and Lassman-Vague V: Stress antecedent and immune status in recently diagnosed type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetes Metab* 15: 45–50, 1989

<sup>109</sup> Thernlund GM, Dahlquist G, Hansson K, Ivarsson SA, Ludvigsson J, Sjöblad S, and Hägglöf B: Psychological stress and the onset of IDDM in children: a case-control study. *Diabetes Care* 18: 1323–1329, 1995

<sup>110</sup> Sepa A, Wahlberg J, Vaarala O, Frodi A, Ludvigsson J. psychological stress may induce diabetes-related autoimmunity in infancy. *Diabetes Care* 28:290-5, 2005

<sup>111</sup> Eisenbarth GS. Pathogenesis of type 1A diabetes. *Endotext.com*, 2004

<sup>112</sup> Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358:221-29, 2001

<sup>113</sup> Verge CF, Stenger D, Bonifacio E, et al. Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop. *Diabetes* 47:1857-66, 1998

<sup>114</sup> Botazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 2:1279-1282, 1974

<sup>115</sup> Atkinson MA, Kaufman DL, Newman D, Tobin AJ, Maclaren NK. Islet cell cytoplasmic auto-antibody reactivity to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 91:350-356, 1993

- 
- <sup>116</sup> Gianani R, Eisenbarth GS. The stages of type 1A diabetes: 2005. *Immunological Reviews* 204:232-249, 2005
- <sup>117</sup> Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA et al. Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes* 45:926-933, 1996
- <sup>118</sup> Bonifacio E, Atkinson M, Eisenbarth GS, Serreze D, Kay TW, Lee-Chan E et al. International workshop on autoimmunity in animal models of autoimmune diabetes identifies insulin, but not GAD or IA-2 as specific antigens of humoral autoimmunity in the non-obese diabetic mouse. *Diabetes* 50:2451-2458, 2001
- <sup>119</sup> Rosenbauer J, Herzig P, von Kries R, Neu A, Giani G. Temporal, seasonal, and geographical incidence patterns of type 1 diabetes mellitus in children under 5 years of age in Germany. *Diabetologia* 42:1055-1059, 1999
- <sup>120</sup> Metzger DL. Current approaches to the prevention of type 1 diabetes. *BC Medical Journal* 46:446-450, 2004
- <sup>121</sup> Itoh N, Hanafusa T, Miyazaki A, Miyagawa J, Yamagata K, Yamamoto K, Waguri M, Imagawa, Tamura S, Inada M, Kawata S, Tarui S, Kono N, Matsuzawa Y. Mononuclear cell infiltration and its relation to the expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in pancreas biopsy specimens from newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Clin Invest* 92:2313-2322, 1993
- <sup>122</sup> Imagawa A, Hanafusa T, Tamura S, Moriwaki M, Itoh N, Yamamoto K, Iwahash H, Yamagata K, Waguri M, Nanmo T, Uno S, Nakajima H, Namba M, Kawata S, Miyagawa J, Matsuzawa Y. Pancreatic biopsy as a procedure for detecting in situ autoimmune phenomena in type 1 diabetes. Close correlation between serological markers and histological evidence of cellular autoimmunity. *Diabetes* 50:1269-1273, 2001

- 
- <sup>123</sup> Foulis AK, McGill M, Farquharson MA, Hilton DA. A search for evidence of viral infection in pancreases of newly diagnosed patients with IDDM. *Diabetologia* 40:53-61, 1997
- <sup>124</sup> Huang X, Yuang J, Goddard A, Foulis A, James RF, Lernmark A, Pujol-Borrell R, Rabinovitch A, Somoza N, Stewart TA Interferon expression in the pancreases of patients with type I diabetes. *Diabetes* 44:658-64, 1995
- <sup>125</sup> Somoza N, Vargas F, Roura-Mir Carme, Vives-Pi M, Fernández-Figueras MT, Ariza A, Gomis R, Bragado R, Martí M, Jaraquemada D, Pujol-Borrell R. Páncreas in recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. Changes in HLA, adhesion molecules and autoantigens, restricted T cell receptor vbeta usage and cytokine profile. *J Immunol* 153: 1360-1377, 1994
- <sup>126</sup> Vives-Pi M, Armengol MP, Alcalde L, Somoza N, Vargas F, Jaraquemada D, Pujol-Borrell R. Expression of transporter associated with antigen processing-1 (TAP-1) in the endocrine cells of human pancreatic islets: effect of cytokines and evidence of hyperexpression in IDDM. *Diabetes* 45:779, 1996
- <sup>127</sup> Moriwaki M, Itoh N, Miyagawa J, et al. Fas and Fas ligand expression in inflamed islets in pancreas sections of patients with recent-onset type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 42:574-78, 1999
- <sup>128</sup> Yoon JW, Jun HS. Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann NY Acad Sci* 928:200-211, 2001
- <sup>129</sup> Poirot L, Benoist C, Mathis D. Natural killer cells distinguish innocuous and destructive forms of pancreatic islet autoimmunity in NOD mice. *Proc Natl Ac Sci USA* 101:8102-8107, 2004
- <sup>130</sup> Almawi WY, Tamim H, Azar ST. T helper type 1 and 2 cytokines mediate the onset and progression of type I (insulin-dependent) diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1497-1502, 1999

- 
- <sup>131</sup> Zekzer D, Wong FS, Ayalon O, et al. GAD-reactive CD4+ Th1 cells induce diabetes in NOD/SCID mice. *J Clin Invest* 101:68-73, 1998
- <sup>132</sup> Hancock WW, Polanski M, Zhang J, Blogg N, Weiner HL. Suppression on insulinitis in nonobese diabetic (NOD) mice by oral insulin administration is associated with selective expression of inteleukin-4 and-10, transforming growth factor- $\beta$  and prostaglandin E. *Am J Pathol* 147:1193-1199, 1995
- <sup>133</sup> Faust A, Rothe H, Schade U, Lampeter E, Kolb H. Primary non-function of islet grafts in autoimmune diabetic nonobese diabetic mice is prevented by treatment with interleukin-4 and interleukin-10. *Transplantation* 62:648-652, 1996
- <sup>134</sup> Lehmann PV, Sercerz EE, Forsthuber T, Dayan CM, Gammon G. Determinant spreading and the dynamics of the autoimmune T cell repertoire. *Immunol Today* 14:203-207, 1993
- <sup>135</sup> Faulkner-Jones BE, Dempsey-Collier M, Mandel TE, Harrison LC. Both Th1 and Th2 cytokine mRNAs are expressed in the NOD mouse pancreas in vivo. *Autoimmunity* 23:99-110, 1996
- <sup>136</sup> Balasa B, Sarvetnick N. The paradoxical effect of interleukin 10 in the immunoregulation of autoimmune diabetes. *J Autoimmun* 9:283-286, 1996
- <sup>137</sup> Panagiotopoulos C, Trudeau JD, Tan R. T-cell epitopes in type 1 diabetes. *Curr Diab Rep* 4:87-94, 2004
- <sup>138</sup> Lieberman SM, DiLorenzao TP. A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 62:359-377, 2003
- <sup>139</sup> Salinas I, Pizarro E. Insulinoteràpia. En Diabetes Mellitus, pp 245-267, Associació Catalana de Diabetes, Barcelona, 1996

- 
- <sup>140</sup> Micaló T, Figuerola D. Esquema terapèutic de la diabetis. En *Diabetes Mellitus*, pp 159-171, Associació Catalana de Diabetes, Barcelona, 1996
- <sup>141</sup> Gomis R. Tratamiento. En *Diabetes 2000-I*, pp 131, 2ª Edición, Lilly, Barcelona, 2000
- <sup>142</sup> Vajo Z, Duckworth WC. Genetically engineered insulin analogs: diabetes in the new millennium. *Pharmacol Rev* 52:1-9, 2000
- <sup>143</sup> Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, Idezuki Y, Goetz FC. Allograft transplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery* 61:827-37, 1967
- <sup>144</sup> American Diabetes Association. Pancreas transplantation for patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 26:S120, 2003
- <sup>145</sup> Gruessner RWG, Sutherland DER, Gruessner AC. Mortality assessment for pancreas transplants. *Am J Transplant* 4:2018-2026, 2004
- <sup>146</sup> Robertson PR. Medical progress: islet transplantation as a treatment for diabetes – A work in progress. *N Engl J Med* 350:694-705, 2004
- <sup>147</sup> Ballinger WF, Lacy PE. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 72:175-176, 1972
- <sup>148</sup> Largiader F, Kolb E, Binswanger U. A long-term functioning human pancreatic islet allotransplantation. *Transplantation*, 3:513-6, 1992
- <sup>149</sup> Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 37:413-420, 1988

- 
- <sup>150</sup> Robertson GS, Chadwick DR, Contractor H, James RF, London NJ. The optimization of large-scale density gradient isolation of human islets. *Acta Diabetol* 30:93-98, 1993
- <sup>151</sup> Shapiro J, Lakey J, Ryan E, Korbitt G, Coth E, Warnock G, Kneteman N, Rajotte R. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343:230-238, 2000
- <sup>152</sup> Ryan EA, Lakey JR, Paty BW, Imes S, Korbitt GS, Kneteman NM, Bigam D, Rajotte RV, Shapiro AM. Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long term control. *Diabetes* 51:2148-2157, 2002
- <sup>153</sup> Vargas F, Vives-Pi M, Somoza N, Alcalde L, Armengol P, Marti M, Serradell L, Costa M, Fernandez-Llamazares J, Sanmarti A, Pujol-Borrell R. Advantages of using a cell separator and metrizamide gradients for human islet purification. *Transplantation* 61:1562-6, 1996
- <sup>154</sup> Ryan EA, Lakey JRT, Rajotte RV, Korbitt GS, Kin T, Imes S, Rabinovich A, Elliot JF, Bigam D, Kneteman N, Warnock GL, Larsen I, Shapiro AMJ. Clinical Outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* 50:710-719, 2001
- <sup>155</sup> Vargas F, Vives-Pi M, Somoza N, Armengol P, Alcalde L, Marti M, Costa M, Serradell L, Dominguez O, Fernandez-Llamazares J, Julian JF, Sanmarti A, Pujol-Borrell R. Endotoxin contamination may be responsible for the unexplained failure of human pancreatic islet transplantation. *Transplantation* 65:722-7, 1998
- <sup>156</sup> Ching CD, Harland RC, Collins BH, Kendall W, Hobbs H, Opara EC. A reliable method for isolation of viable porcine islet cells. *Arch Surg* 136:276-279, 2001

- 
- <sup>157</sup> Lakey JR, Helms LM, Kin T, Korbutt GS, Rajotte RV, Shapiro AM, Warnock GL. Serine-protease inhibition during islet isolation increases islet yield from human pancreases with prolonged ischemia. *Transplantation* 72:565-570, 2001
- <sup>158</sup> Lakey JR, Kneteman NM, Rajotte RV, Wu DC, Bigam D, Shapiro AM. Effect of core pancreas temperature during cadaveric procurement on human islet isolation and functional viability. *Transplantation* 73:1106-1110, 2002
- <sup>159</sup> Hering BJ, Kandaswamy R, Harmon JV, et al. Transplantation of cultured islets from two-layer preserved pancreases in type 1 diabetes with anti-CD3 antibody. *Am J Transplant* 4:390-401, 2004
- <sup>160</sup> Luna A, Julián JF, Alba A, Colobran R, Garcia-Cuyàs F, Fernández-Figueras MT, Broggi MA, Llamazares JF, Pujol-Borrell R, Vives-Pi M. Islet transplantation in seminal vesicles restores glycemia in diabetic rats: a preliminary study. *Transplant Proc* 34:196-199, 2002
- <sup>161</sup> Gros L, Riu E, Montoliu L, Ontiveros M, Lebrigand L, Bosch F. Insulin production by engineered muscle cells. *Hum Gene Ther* 10:1207-17, 1999
- <sup>162</sup> Ayuso E, Chillón M, Agudo J, Haurigot V, Bosch A, Carretero A, Otaegui PJ, Bosch F. In vivo gene transfer to pancreatic beta cells by systemic delivery of adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 15:805-12, 2004
- <sup>163</sup> Halban PA, Kahn SE, Lernmark A, Rhodes CJ. Gene and cell-replacement therapy in the treatment of type 1 diabetes. *Diabetes* 50:2181-2191, 2001
- <sup>164</sup> Yoon JW, Jun HS. Recent advances in insulin gene therapy for type 1 diabetes. *Trends Mol Med* 8:63-68, 2002
- <sup>165</sup> Chan L, Fujimiya M, Kojima H. In vivo gene therapy for diabetes mellitus. *Trends Mol Med* 9:430-435, 2003

- 
- <sup>166</sup> Roche E, Soria B. Generation of new islets from stem cells. *Cell Biochem Biophys* 40:113-124, 2004
- <sup>167</sup> Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292:1389-1394, 2001
- <sup>168</sup> Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 49, 2000
- <sup>169</sup> Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 50:1691-1697, 2001
- <sup>170</sup> Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7999-8004, 2000
- <sup>171</sup> Alba A, Verdaguer J, Vives-pi M. Diabetes mellitus tipo 1: autoinmunidad frente a la célula beta. *Endocrinol Nutr* 51:121-5, 2004
- <sup>172</sup> American Diabetes Association. Prevention of Type 1 diabetes.
- <sup>173</sup> DPT-1 Study Group. The diabetes prevention Trial-Type 1 diabetes (DPT-1): implementation of screening and staging of relatives. *Transplant Proc* 27:3377, 1995
- <sup>174</sup> Knip M, Douek IF, Moore et al. Safety of high-dose nicotinamide: a review. ENDIT Group. Nicotinamide Diabetes Intervention Trial. *Diabetologia* 43:1337-45, 2000



---

<sup>175</sup> Gale EAM. European Nicotinamide Diabetes Intervention Trial (ENDIT): a randomised controlled trial of intervention before the onset of type 1 diabetes. *Lancet* 363:925-931, 2004

<sup>176</sup> Akerblom HK, Savilahti E, Saukkonen TT et al. The case for elimination of cow's milk in early infancy in the prevention of type 1 diabetes: The Finnish experience. *Diabetes Metab Rev* 9:269-278, 1993

<sup>177</sup> Akerblom HK, Virtanen SM, Hamaalainen A, et al. Emergence of diabetes-associated autoantibodies in the nutritional prevention of IDDM (TRIGR) project. *Diabetes* 48(Suppl 1):A45, 1999

<sup>178</sup> Bougneres PF, Carel JC, Castaño L, Boitard C, Gardin JP, Landais P, Hors J, Mihatsch MJ, Paillard M, Chaussain JL, et al. Factors associated with early remission of type 1 diabetes in children treated with cyclosporine. *N Engl J Med* 318:663-670, 1988

<sup>179</sup> Raz I, Elias D, Avron A, et al. Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (Diapep277): A randomized, double-blind, phase II trial. *Lancet* 358:1749-1753, 2001

<sup>180</sup> Herold KC, Hagopian W, Auger JA, et al. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 346:1692-1698, 2002

<sup>181</sup> Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler AG, Mathieu C, Kaufman L, Hale G, Gorus F, Goldman M, Walter M, Candon S, Schandene L, Crenier L, De Block C, Seigneurin JM, De Pauw P, Pierard D, Weets H, Bach JF, Pipeleers D, Chatenoud L. Insulin levels after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med* 352:2598-608, 2005

<sup>182</sup> Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL. Virus-induced diabetes mellitus: isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med* 300:1173-1179, 1979

- 
- <sup>183</sup> Gamble DR, Taylor KW. Seasonal incidence of diabetes mellitus. *BMJ* 3:631-633, 1969
- <sup>184</sup> Banatvala JE, Bryant J, Schernthaner G, Borkenstein M, Schober E, Brown D, et al. Coxsackie B, mumps, rubella and cytomegalovirus specific IgM responses in patients with insulin-dependent diabetes mellitus in Britain, Austria and Australia. *Lancet* 1:1409-1412, 1985
- <sup>185</sup> Foulis AK, Farquharson MA, Meager A. Immunoreactive alpha interferon in insulin secreting beta cells in type 1 diabetes mellitus. *Lancet* 2:1423-1427, 1987
- <sup>186</sup> Lonrot M, Salminen K, Knip M, Savola K, Kulmala P, Leinikki P, et al. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. Enterovirus RNA in serum is a risk factor for beta-cell autoimmunity and clinical type 1 diabetes: a prospective study. *J Med Virol* 61:214-220, 2000
- <sup>187</sup> Ginsberg-Fellner F, Witt ME, Yagihaski S, Dobersen MJ, Taub F, Fedun B, et al. Congenital rubella syndrome as a model for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: increased prevalence of islet cell surface antibodies. *Diabetologia* 27: 87–89, 1984
- <sup>188</sup> Rubinstein P, Walker ME, Fedun B, Witt ME, Cooper LZ, Ginsberg-Fellner F. The HLA system in congenital rubella patients with and without diabetes. *Diabetes* 31:1088-1091, 1982
- <sup>189</sup> Ou D, Mitchell LA, Metzger DL, Gillam S, Tingle AJ. Crossreactive rubella virus and glutamic acid decarboxylase (65 and 67) protein determinants recognized by T cells of patients with type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 43: 750–762, 2000

- 
- <sup>190</sup> Rayfield EJ, Kelly KJ, Yoon JW. Rubella virus-induced diabetes in the hamster. *Diabetes* 35:1278-1281, 1986
- <sup>191</sup> Salminen K, Sadeharju K, Lönnrot M, Vähäsalo P, Kupila A, Coreonen S et al. Enterovirus infections are associated with the induction of beta-cell autoimmunity in a prospective birth cohort study. *J Med Virol* 69:91-98, 2003
- <sup>192</sup> Mertens T, Gruneklee D, Eggers HJ. Neutralizing antibodies against Coxsackie B viruses in patients with recent onset of type 1 diabetes. *Eur J Pediatr* 140:293-294, 1983
- <sup>193</sup> Juhela S, Hyoty H, Roivainen M, Harkonen T, Putto-Laurila A, Simell O, et al. T-cell responses to enterovirus antigens in children with type 1 diabetes. *Diabetes* 49:1308-1313, 2000
- <sup>194</sup> Enterovirus infections with beta-cell tropic strains are frequent in siblings of children diagnosed with type 1 diabetes and in association with elevated levels of GAD65 antibodies. *J Med Virol* 73:450-459, 2003
- <sup>195</sup> Harkonen T, Lankinen H, Davydova B, Hovi T and Roivainen M. Enterovirus infection can induce immune responses that cross-react with beta-cell autoantigen tyrosine phosphatase IA-2/IAR. *J Med Virol* 66:340-350, 2002
- <sup>196</sup> Lönnrot M, Salminen K, Knip M, et al., Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. Enterovirus RNA in serum is a risk factor for beta cell autoimmunity and clinical type 1 diabetes: a prospective study. *J Med Virol* 61: 214–220, 2000
- <sup>197</sup> Szopa TM, Ward T, Taylor KW. Impaired metabolic functions in human pancreatic islets following infection with Coxsackie B4 virus *in vitro*. *Diabetologia* 30: 587A, 1986

- 
- <sup>198</sup> Triantafilou K, Triantafilou M. Coxsackievirus B4-induced cytokine production in pancreatic cells is mediated through toll-like receptor 4. *J Virol* 78:11313-11320, 2004
- <sup>199</sup> Hindersson M, Asma E, Örn A, Tuverno T, Frisk G. Simultaneous type 1 diabetes onset in mother and son coincident with an enteroviral infection. *J Clin Virol* 33:158-167, 2005
- <sup>200</sup> Viskari H, Ludvinson J, Uibo R, Salur L, Marciulionyte D, Hermann R, Soltesz G, Fuchtenbusch M, Ziegler AG, Kondrashova A, Romanov A, Knip M, Hyoty H. Relationship between the incidence of type 1 diabetes and enterovirus infections in different European populations: results from the EPIVIR project. *J Med Virol* 72:610-617, 2004
- <sup>201</sup> Benoist C, Mathis D. Autoimmune diabetes: Retrovirus as trigger, precipitator or marker? *Nature* 388:833-834, 1997
- <sup>202</sup> Nakagawa K, Harrison LC. The potencial role of endogenous retroviruses in autoimmunity. *Immunol Rev* 152:193-236, 1996
- <sup>203</sup> Hao W, Serreze DV, McCulloch DK, Neifing JL, Palmer JP. Insulin (auto) antibodies from human IDDM cross-react with retroviral antigen p73. *J Autoimmun* 787-798, 1993
- <sup>204</sup> Conrad B, Weidmann E, Trucco G, Rudert WA, Behboo R, Ricordi C, Rodriguez-Rilo H, Finegold D, Trucco M. Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology. *Nature* 371:351-355, 1994
- <sup>205</sup> Conrad B, Weissmahr RN, Böni J, Arcari R, Schüpbach J, Mach B. A human endogenous retroviral superantigen as a candidate autoimmune gene in type 1 diabetes. *Cell* 90:303-313, 1997

- 
- <sup>206</sup> Stauffer Y, Marguerat S, Meylan F, et al. Interferon-alpha-induced endogenous superantigen: a model linking environment and autoimmunity. *Immunity* 15:591-601, 2001
- <sup>207</sup> Suenaga K, Yoon JW. Association of beta-cell specific expresión of endogenous retrovirus with thee development of insulitis and diabetes in NOD mice. *Diabetes* 37:1722-1726, 1988
- <sup>208</sup> Onodera T, Jenson AB, Yoon JW, Notkins AL. Virus-induced diabetes mellitus: reovirus infection of pancreatic beta cells in mice. *Science* 301:529-531, 1978
- <sup>209</sup> Onodera T, Toniolo A, Ray UR, Jonson AB, Knazek RA, Notkins AL. Virus-induced diabetes mellitus. *J Exp Med* 153:1457-1465, 1981
- <sup>210</sup> Yoon JW, Selvaggio S, Onodera T, Wheeler J, Jenson AB. Infection of cultures human pancreatic beta cells with reovirus type 3. *Diabetologia* 20:462-467, 1981
- <sup>211</sup> Honeyman M C, Coulson B S, Stone N L, Gellert S A, Goldwater P N, Steele C E, Couper J J, Tait B D, Colman P G, and Harrison L C. Association Between Rotavirus Infection and Pancreatic Islet Autoimmunity in Children at Risk of Developing Type 1 Diabetes. *Diabetes* 49:1319–1324, 2000
- <sup>212</sup> Gundersen J. Is diabetes of infectious origin? *J Infect Dis* 41:197-202, 1927
- <sup>213</sup> Hyoty H, Leinikki P, Reunanen A, Ilonen J, Surcel HM, Rilva A, Kaar ML, Huupponen T, Hakulinen A, Makela AL and Akerblom HK. Mumps infections in the etiology of type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetes Res* 9:111-116, 1988
- <sup>214</sup> Gamble DR. Relation of antecedent illness to development of diabetes in children. *Br Med J* 2:99-101, 1980

- 
- <sup>215</sup> Prince G, Jenson AB, Billups L, Notkins AL. Infection of human pancreatic beta cell cultures with mumps virus. *Nature* 27:158-161, 1978
- <sup>216</sup> Pak CY, Eun HM, McArthur RG, Yoon JW. Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet* 2:1-4, 1988
- <sup>217</sup> Pak CY, Cha CY, Rajotte RV, McArthur RG, Yoon JW. Human pancreatic islet cell-specific 38 kDa autoantigen identified by cytomegalovirus-induced monoclonal islet cell autoantibody. *Diabetologia* 33: 569–572, 1990
- <sup>218</sup> Hiemstra HS, Schloot NC, van Veelen PA, *et al.* Cytomegalovirus in autoimmunity: T cell crossreactivity to viral antigen and autoantigen glutamic acid decarboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 3988–3991, 2001
- <sup>219</sup> Bae YS, Eun HM, Yoon JW. Genomic differences between the diabetogenic and nondiabetogenic variants of encephalomyocarditis virus. *Virology* 170:282-7, 1989
- <sup>220</sup> Jun HS, Yoon JW. A new look at viruses in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 19:8-31, 2003
- <sup>221</sup> Guberski DL, Thomas VA, Shek WR, *et al.* Induction of type I diabetes by Kilham's rat virus in diabetes-resistant BB/Wor rats. *Science* 254: 1010–1013, 1991
- <sup>222</sup> Chung YH, Jun H S, Son M, Bao M, Bae H Y, Kang Y and Yoon J W. Cellular and molecular mechanism for Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in DR-BB rats. *J Immunol* 165:2866, 2000
- <sup>223</sup> Chung YH, Jun HS, Hirasawa K, Lee BR, van Rooijen N, Yoon JW. Role of macrophages and macrophage-derived cytokines in the pathogenesis of Kilham rat virus-induced autoimmune diabetes in diabetes-resistant BB rats. *J Immunol*

---

159: 466–471, 1997

<sup>224</sup> Parkkonen F, Hyöty H, Ilonen J, Reijonen H, Yla-Herttuala S, Leinikki P. Antibody reactivity to an Epstein-Barr virus BERF4-encoded epitope occurring also in Asp-57 region of HLA-DQ8b chain. *Clin Exp Immunol* 95: 287–293, 1994

<sup>225</sup> Yoon JW, Morishima T, McClintock PR, Austin M, Notkins AL. Virus-induced diabetes mellitus: mengovirus infects pancreatic beta cells in strains of mice resistant to encephalomyocarditis virus. *J Virol* 50: 684–690, 1984

<sup>226</sup> Tajima M, Yazawa T, Hagiwara K, Kurosawa T, Takahashi K. Diabetes mellitus in cattle infected with bovine viral diarrhoea mucosal disease virus. *J Vet Med A* 39: 616–620, 1992

<sup>227</sup> Taniyama H, Hirayama k, Kagawa Y, Ushiki T, Kurosawa T, Furuoka H, Ono T. Immunohistochemical demonstration of bovine viral diarrhoea virus antigen in the pancreatic islet cells of cattle with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Comp Pathol* 121:149-57, 1999

<sup>228</sup> Niklasson B, Heller KE, Schonecker B et al. Development of type 1 diabetes in wild bank voles associated with islet autoantibodies and the novel Ljungan virus. *Int J Exp Diabetes Res* 4:35-34, 2003

<sup>229</sup> Jun HS, Yoon JW. Viral infections and type 1 diabetes. En *Infection and Autoimmunity* pp 229-249, 2004

<sup>230</sup> Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Citocinas. En *Inmunología*. pp 294-31. 5ª Edición. Mc Graw Hill Interamericana, México, 2003

<sup>231</sup> Oppenheim JJ, Feldmann M. Introduction to the role of cytokines in innate host defense and adaptative immunity. En *Cytokine Reference*. Volume 1. pp 3-20, Academic Press, Harcourt, 2000

- 
- <sup>232</sup> Haque SJ, Williams BRG. IFN $\alpha/\beta$  receptor. En Cytokine Reference. Volume 1. pp 1845-1854, Academic Press, Harcourt, 2000
- <sup>233</sup> Bogdan C, Mattner J, Schleicher U. The role of type I interferons in non-viral infections. *Immunological Reviews* 202:33-48, 2004
- <sup>234</sup> MS Kunzi, Rowe PP. IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  and IFN $\omega$  ligands. Cytokine Reference. Volume 1. pp 628-639, Academic Press, Harcourt, 2000
- <sup>235</sup> Sen GC. Viruses and interferons. *Ann Rev Microbiol* 55:255-81, 2001
- <sup>236</sup> Stark GR, Kerr IM, Williams BRG, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67:227-64, 1998
- <sup>237</sup> Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 23:307-336, 2005
- <sup>238</sup> Beutler B. Interferences, questions and possibilities in toll-like receptors signalling. *Nature* 430:257-263, 2004
- <sup>239</sup> Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15623-28, 1998
- <sup>240</sup> Mattner J, Wandersee-Steinhäuser A, Pahl A, Röllinghoff M, Majeau GR, Hochman PS, Bogdan C. Protection against progressive Leishmaniasis by IFN- $\beta$ 1. *J Immunol* 172:7574-7582, 2004
- <sup>241</sup> Biron CA. Interferons alpha and beta as immune regulators – a new look. *Immunity* 14:661-664, 2001



- 
- <sup>242</sup> Benavides FJ, Guénet JL. Las líneas genéticamente estandarizadas y los controles de la pureza genética. En Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones. pp 105-136. Universidad de Alcalá, Madrid, 2003
- <sup>243</sup> Crow JF. C. C. Little, cancer and inbred mice. *Genetics* 161:1357-61, 2002
- <sup>244</sup> Rogner UT, Avner P. Congenic mice: cutting tools for complex immune disorders. *Nature Reviews* 3:243-252, 2003
- <sup>245</sup> Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic bet-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 43:1528-1533, 2000
- <sup>246</sup> Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: a new model of diabetes mellitus. *Science* 193:415-417, 1976
- <sup>247</sup> Rossini AA, Like AA, Chick WL, Appel MC, Cahill GF. Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:2485-2489, 1977
- <sup>248</sup> Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in beta cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50:536-546, 2001
- <sup>249</sup> Munday R. Dialuric acid autoxidation. Effects of transition metals on the reaction rate and on the generation of "active oxygen" species. *Biochem Pharmacol* 37:409-413, 1988
- <sup>250</sup> Harada M, Makino S. Promotion of spontaneous diabetes in non-obese diabetes prone mice by cyclophosphamide. *Diabetologia* 27:604-606, 1984

- 
- <sup>251</sup> Yasunami R, Bach JF. Antisupressor effect of cyclophosphamide on the development of spontaneous diabetes in NOD mice. *Eur J Immunol* 18:481-484, 1988
- <sup>252</sup> Charlton B, Bacelj A, Mandel TE. Administration of silica particles or anti-Lyt2 antibody prevents beta-cell destruction in NOD mice given cyclophosphamide. *Diabetes* 37:930-935, 1988
- <sup>253</sup> Makino S, Kunimoto K, Murakoa Y, Mizushima Y, Katagiri K et al. Breeding of a non-obese diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 29:1-13, 1980
- <sup>254</sup> Kikutani H, Makino S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol* 51:285-322, 1992
- <sup>255</sup> Wicker LS, Miller BJ, Mullen Y. Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes* 35:855-60, 1986
- <sup>256</sup> Bendelac A, Carnaud C, Boitard C, Bach JF. Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *J Exp Med* 166:823-32, 1987
- <sup>257</sup> Hu Y, Nakagawa Y, Purushotham KR, Humphreys-Beher MG. Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 263:E607-14, 1992
- <sup>258</sup> Many MC, Maniratunga S, Deneff JF. The non-obese diabetic (NOD) mouse: an animal model for autoimmune tiroiditis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104:17-20, 1996
- <sup>259</sup> Salomon B, Rhee L, Bour-Jordan H, Hsin H, Montag A et al. Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2 deficient NOD mice. *J Exp Med* 194:677-84, 2001

- 
- <sup>260</sup> Silveira PA, Baxter AG. The NOD mouse as a model of SLE. *Autoimmunity* 34:53-64, 2001
- <sup>261</sup> Tisch R, McDevitt H. Insulin dependent diabetes mellitus. *Cell* 85:291-97, 1996
- <sup>262</sup> Todd JA, Acha-Orbea H, Bell JI, Chao N, Fronck Z, Jacob CO, McDermott M, Sinha AA, Timmerman L, Steinman L, McDevitt HO. A molecular basis for MHC class II-associated autoimmunity. *Science* 240:1003-1009, 1988
- <sup>263</sup> Serreze DV, Gaedeke JW, Leiter EH. Hematopoietic stem-cell defects underlying abnormal macrophage development and maturation in NOD/Lt mice: defective regulation of cytokine receptors and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9625-29, 1993
- <sup>264</sup> Prochazka M, Leiter EH, Serreze DV, Coleman DL. Three recessive loci required for insulin-dependent diabetes in NOD mice. *Science* 89:237-286, 1987
- <sup>265</sup> Kataoka S, Satoh J, Fujiya H, Toyota T, Suzuki R, et al. Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity. *Diabetes* 18:41-51, 1983
- <sup>266</sup> Ogasawara K, Hamernman JA, Hsin H, Chikuma S, Bour-Jordan H, et al. Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity* 18:41-51, 2003
- <sup>267</sup> Carnaud C, Gombert J, Donnars O, Garchon H, Herbelin. Protection against diabetes and improved NK/NKT cells performance in NOD.NK1.1 mice congenic at the NK complex. *J Immunol* 166:2404-11, 2001

- 
- <sup>268</sup> Wang B, Geng YB, Wang CR. CD1-restricted NKT cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes. *J Exp Med* 194:313-20, 2001
- <sup>269</sup> Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Ann Rev Immunol* 23:447-85, 2005
- <sup>270</sup> Zipris D, Lazarus AH, Crow AR, Hadazija M, Delovitch L. Defective thymic T cell activation by concanavalin A and anti-CD3 in autoimmune nonobese diabetic mice: Evidence of thymic T cell anergy that correlates with the onset of insulinitis. *J Immunol* 146:3763-3771, 1991
- <sup>271</sup> Baxter AG, Cooke A. Complement lytic activity has no role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 42:1574-78, 1993
- <sup>272</sup> Kanagawa O, Martín SM, Vaupel BA, Carrasco-Marín E, Unanue ER. Autoreactivity of T cells from nonobese diabetic mice: an I-Ag7-dependent reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1721-24, 1998
- <sup>273</sup> Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* 2:1032-39, 2001
- <sup>274</sup> Kishimoto H, Sprent J. A defect in central tolerance in NOD mice. *Nat Immunol* 2:1025-31, 2001
- <sup>275</sup> Lesage S, Hartley SB, Akkaraju S, Wilsaon J, Townsend M et al. Failure to censor forbidden clones of CD4 T cells in autoimmune diabetes. *J Exp Med* 196:1175-88, 2002
- <sup>276</sup> Moriyama H, Abiru N, Paronen J, Sikora K, Liu E, et al. Evidence for a primary islet autoantigen (preproinsulin 1) for insulinitis and diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10376-81, 2003

- 
- <sup>277</sup> Thebault-Baumont k, Dubois-Laforgue D, Krief P, Briand JP, Halboul P, et al. Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice. *J Clin Invest* 111:851-57, 2003
- <sup>278</sup> Zuklys S, Balciunaite G, Agarwal A, Fasler-Kan E, Palmer E, Hollander GA. Normal thymic architecture and negative selection are associated with aire expresión, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). *J Immunol* 165:1976-83, 2000
- <sup>279</sup> Lenschow DJ, Ho SC, Sattar H, Rhee L, Gray G et al . Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp Med* 181:1145-55, 1995
- <sup>280</sup> Lenschow DJ, Herold KC, Rhee L, Patel B, Koons A, et al. CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity* 5: 285-93, 1996
- <sup>281</sup> Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, et al. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally relates to CD28. *Nature* 397:263-66, 1999
- <sup>282</sup> Herman AE, Freeman GJ, Mathis D, Benoist C. CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J Exp Med* 199:1479-89, 2004
- <sup>283</sup> Balasa B, Krahl T, Patstone G, Lee J, Tisch R, et al. CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulitis and diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 159-4620-27, 1997
- <sup>284</sup> Green EA, Wong FS, Eshima K, Mora C, Flavell RA. Neonatal tumor necrosis factor  $\alpha$  promotes diabetes in nonobese diabetic mice by CD154-independent antigen presentation to CD8+ T cells. *J Exp Med* 191:225-38, 2000

- 
- <sup>285</sup> Marleau AM, Singh B. Myeloid dendritic cells in non-obese diabetic mice have elevated costimulatory and T helper-inducing abilities. *J Autoimmun* 198:23-35, 2002
- <sup>286</sup> Liu J, Beller DI. Distinct pathways for NF- $\kappa$ B regulation are associated with aberrant macrophage IL-12 production in lupus- and diabetes-prone mouse strains. *J Immunol* 170:4489-96, 2003
- <sup>287</sup> Koarada S, Wu Y, Olshansky G, Riddway WM. Increased nonobese diabetic Th1:Th2 (IFN $\gamma$ :IL-4 ratio) is CD4+ cells intrinsic and independent of APC genetic background. *J Immunol* 169:6580-87, 2002
- <sup>288</sup> Hammond KJ, Pellicci DG, Poulton LD, Naidenko OV, Scalzo AA, et al. CD1d-restricted NKT cells: an interstrain comparison. *J Immunol* 167:1164-73, 2001
- <sup>289</sup> Godfrey DI, Kinder SJ, Silveira P, Baxter AG. Flow cytometric study of T cell development in NOD mice reveals a deficiency in  $\alpha\beta$ TCR+CD8-thymocytes. *J Autoimmun* 10:279-85, 1997
- <sup>290</sup> MacDonald HR. Development and selection of NKT cells. *Curr Opin Immunol* 14:250-54, 2002
- <sup>291</sup> Hammond KJ, Poulton LD, Palmisano LJ, Silveira PA, Godfrey DI, et al.  $\alpha\beta$ -T cells 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* 187:1047-56, 1998
- <sup>292</sup> Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, Mi QS, Sondhi J, et al. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune type 1 diabetes. *Nat Med* 7:1057-62, 2001

- 
- <sup>293</sup> Atkinson MA, Wilson SB. Fatal attraction: chemokines and type 1 diabetes. *J Clin Invest* 110:1611-13, 2002
- <sup>294</sup> Wu Q, Salomon B, Chen M, Wang Y, Hoffman L et al. Reversal of spontaneous autoimmune insulinitis in NOD mice by soluble lymphotoxin receptor. *J Exp Med* 193:1327-32, 2001
- <sup>295</sup> Nakhooda AF, Like AA, Chappel CI, Murray FT, Marliss EB. The spontaneously diabetic Wistar rat: metabolic and morphologic studies. *Diabetes* 26:100-112, 2001
- <sup>296</sup> Crisa L, Mordes JP, Rossini AA. Autoimmune diabetes mellitus in the BB rat. *Diabetes Metab Rev* 8:4-37, 1992
- <sup>297</sup> Guberski DL. Diabetes-prone and diabetes-resistant BB rats: animal models of spontaneous and virally induced diabetes mellitus, lymphocytic thyroiditis and collagen-induced arthritis. *ILAR Journal* 35, 1993
- <sup>298</sup> Colle E, Guttman RD, Seemayer T. Spontaneous diabetes mellitus syndrome in the rat. Association with the major histocompatibility complex. *J Exp Med* 154:1237-1242, 1981
- <sup>299</sup> Hornum L, Romer J, Markholst H. The diabetes-prone BB rat carries a frameshift mutation in *Ian4*, a positional candidate of *Iddm1*. *Diabetes* 51:1972-1979, 2002
- <sup>300</sup> MacMurray AJ, Moralejo DH, Kwitek AE, Rutledge EA, van Yserloo B, Gohlke P et al. Lymphopenia in the BB rat model of type 1 diabetes is due to a mutation in a novel immune-associated nucleotide (*Ian*)-related gene. *Genome Res* 12:1029-1039, 2002
- <sup>301</sup> Jackson R, Rassi N, Crump A, Haynes BF, Eisenbarth GS. The BB diabetic rat. Profound T-cell lymphocytopenia. *Diabetes* 30:887-889, 1981

- 
- <sup>302</sup> Delemarre FG, Simons PJ, de Heer HJ, Derxhage HA. Signs of immaturity of splenic dendritic cells from the autoimmune prone biobreeding rat: consequences for the in vitro expansion of regulator and effector T cells. *J Immunol* 162:1795-1801, 1999
- <sup>303</sup> Delemarre FG, Hoogeveen PG, Haan-meulman M, Simona PJ, Drexhage HA. Homotypic cluster formations of dendritic cells, a close correlate of their state of maturation. Defects in the biobreeding diabetes-prone rat. *J Leukoc Biol* 69:373-380, 2001
- <sup>304</sup> Iwakoshi NN, Greiner DL, Rossini AA, Mordes JP. Diabetes prone BB rats are severely deficient in natural killer T cells. *Autoimmunity* 31:1-14, 1999
- <sup>305</sup> Elder ME, MacLaren NK. Identification of profound peripheral T lymphocyte immunodeficiencies in the spontaneously diabetic BB rat. *J Immunol* 130:1723-1731, 1983
- <sup>306</sup> Rozing J, Coolen C, Tielen FJ, Weegenaar J, Schuurman HJ, greiner DL et al. Defects in the thymic epithelial stroma of diabetes prone BB rats. *Thymus* 14:125-135, 1989
- <sup>307</sup> Kawano K, Hiroshima T, Moris S, Sayito Y, Kurosumi M, Natori t. New inbred strain of Long-Evans Tokushima Lean rats with IDDM without lymphopenia. *Diabetes* 40:1375-1381, 1991
- <sup>308</sup> Komeda K, Noda M, Terao K, Kuzuya N, Kanazawa M, Kanazawa Y. Establishment of two substrains, diabetes –prone ans non-diabetic, from Long-Evans Tokushima Lean (LETL) rats. *Endocr J* 45:737-744, 1998
- <sup>309</sup> Yokoi N, Kanazawa M, Kitada K, Tanaka A, Kanazawa Y, Suda S et al. A non-MHC locus essential for autoimmune type 1 diabetes in the Komeda diabetes-prone rat. *J Clin Invest* 100:2015-2021, 1997



- 
- <sup>310</sup> Adorini L, Gregori S, Harrison LC. Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. *Trends Mol Med* 8:31-38, 2002
- <sup>311</sup> Lieberman SM, Evans AM, Han B, Takaki T, Vinnitskaya Y, Caldwell JA, Serreze DV, Shabanowitz J, Hunt DF, Nathenson SG, Santamaria P, DiLorenzo TP. Identification of the beta cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8<sup>+</sup> T cells in autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:8384-8, 2003
- <sup>312</sup> Katz JD, Wang B, Haskins K, Benoist C, Mathis D. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. *Cell* 74:1098-1100, 1993
- <sup>313</sup> Verdaguer J, Yoon JW, Anderson B, Averill N, Utsugi T, Park BJ, Santamaria P. Acceleration of spontaneous diabetes in TCR- $\beta$ -transgenic nonobese diabetic mice by beta-cell cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells expressing identical endogenous TCR- $\alpha$  chains. *J Immunol* 157:4726-4735, 1996
- <sup>314</sup> Uehira M, Uno M, Kumer H, kikutani H, Mort K, Inomoto T, Uede T, Miyazaki J, Nishimoto H, Kishimoto T, Yamamura K. Development of autoimmune insulinitis is prevented in E alpha d but not in A beta k NOD transgenic mice. *Int Immunol* 2:209-213, 1989
- <sup>315</sup> Miyazaki T, Uno M, Uehira M, Kikutani H, Kishimoto T, Kimoto M, Nishimoto H, Miyazaki J, Yamamura K. Direct evidence for the contribution of the unique I-A<sup>nd</sup> to the development of insulinitis in the non-obese diabetic mice. *Nature* 345:722-724, 1990
- <sup>316</sup> Slattery RM, Kjer-Nielsen L, Allison J, Charlton B, Mandel TE, Miller JFAP. Prevention of diabetes in non-obese diabetic I-A<sup>k</sup> transgenic mice. *Nature* 345:724-726, 1990

- 
- <sup>317</sup> Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 14:129-151, 1998
- <sup>318</sup> Allison J, McClive P, Oxbrow L, Baxter A, Morahan G, Miller JF. Genetic requirements for acceleration of diabetes in non-obese diabetic mice by expressing interleukin-2 in islets beta cells. *Eur J Immunol* 24:2535-2541, 1994
- <sup>319</sup> Gallichan WS, Balasam B, Davies JD, Sarvetnick N. Pancreatic IL-4 expression results in islet-reactive Th2 cells that inhibit diabetogenic lymphocytes in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol* 163:1696-1703, 1999
- <sup>320</sup> DiCosmo BF, Picarella D, Flavell RA. Local production of human IL-6 promotes insulinitis but retards the onset of insulin-dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Int Immunol* 6:1829-1837, 1994
- <sup>321</sup> Campbell IL, Hobbs MV, Dockter J, Oldstone MBA, Allison J. Islet inflammation and hyperplasia induced by the pancreatic islet-specific overexpression of interleukin-6 in transgenic mice. *Am J Pathol* 145:157-166, 1994
- <sup>322</sup> Wogensen L, Lee Ms, Sarvetnick N. Production of interleukin 10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of beta cells in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 179:1379-1384, 1994
- <sup>323</sup> Green EA, Eynon EE, Flavell RA. Local expression of TNF-alpha in neonatal NOD mice promotes diabetes by enhancing presentation of islet antigens. *Immunity* 9:733-743, 1998

- 
- <sup>324</sup> Christen U, Wolfe T, Mohrle U, Hughes AC, Rodrigo E, Green EA, Flavell RA, von Herrath MG. A dual role for TNF-alpha in type 1 diabetes: islet-specific expression abrogates the ongoing autoimmune process when induced late but not early during pathogenesis. *J Immunol* 166:7023-7032, 2001
- <sup>325</sup> King C, Davies J, Mueller R, Lee MS, Krahl T, Yeung B, O'Connor E, Sarvetnick N. TGF- $\beta$ 1 alters APC preference, polarizing islet antigen responses toward a Th2 phenotype. *Immunity* 8:601-613, 1998
- <sup>326</sup> Sarvetnick N, Liggitt D, Pitts D, Martin L, McIntyre B, Gregory A, Parslow T, Stewart T. Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon-gamma. *Cell* 52:773-782, 1988
- <sup>327</sup> Sarvetnick N, Shizuru J, Liggitt D, Martin L, McIntyre B, Gregory A, Parslow T, Stewart T. Loss of pancreatic islet tolerance induced by  $\beta$ -cell expression of interferon- $\gamma$ . *Nature* 346:844-847, 1990
- <sup>328</sup> Stewart TA, Hultgren B, Huang X, Pitts-Meek S, Hully J, MacLachlan NJ. Induction of type 1 diabetes by interferon-alpha in transgenic mice. *Science* 260:1942-1946, 1993
- <sup>329</sup> Pelegrin M, Devedjian JC, Costa C, Visa J, Solanes G, Pujol A, Asins G, Valera A, Bosch F. Evidence from transgenic mice that interferon-beta may be involved in the onset of diabetes mellitus. *JBC* 273:12332-12340, 1998
- <sup>330</sup> Alba A, Puertas MC, Carrillo J, planas R, Ampudia R, Pastor X, Bosch F, Pujol-Borrell R, Verdaguer J, Vives-Pi M. IFN $\beta$  accelerates autoimmune type 1 diabetes in nonobese diabetic mice and breaks the tolerance to  $\beta$  cells in nondiabetes-prone mice: *J Immunol* 173:6667-6675, 2004
- <sup>331</sup> Vassileva, G., S.C. Chen, M. Zeng, S. Abbondanzo, K. Jensen, D. Gorman, B.M. Baroudy, Y. Jiang, N. Murgolo, S.A. Lira. Expression of a novel murine

---

type I IFN in the pancreatic islets induces diabetes in mice. *J Immunol* 170:5748, 2003

<sup>332</sup> Kim J, Richter W, Aanstoot HJ, Shi Y, Fu Q, Rajotte R, Warnock G, Baekkeskov S. Differential expression of GAD 65 and GAD 67 in human, rat, and mouse pancreatic islets. *Diabetes* 42:1799-808, 1993

<sup>333</sup> French MB, Allison J, Cram DS, Thomas HE, Dempsey-Collier M, Silva A, Georgiou HM, Kay TW, Harrison LC, Lew AM. Transgenic expression of mouse preproinsulin II prevents diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 46:34-39, 1997

<sup>334</sup> Geng L, Solimena M, Flavell RA, Sherwin RS, Hayday AC. Widespread expression of an autoantigen-GAD65 transgen does not tolerize non-obese diabetic mice and can exacerbate disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10055-10060, 1998

<sup>335</sup> Birk OS, Douek DC, Elias D, Takacs K, Dewchand H, Gur SL, Walker MD, van der Zee R, Cohen IR, and Altmann DM. A role of Hsp60 in autoimmune diabetes: analysis in a transgenic model. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1032-1037, 1996

<sup>336</sup> Wong S, Guerder S, Visintin I, Reich EP, Swenson KE, Flavell RA, Janeway CA. Expression of the co-stimulator molecule B7-1 in pancreatic beta-cells accelerates diabetes in the NOD mouse. *Diabetes* 44:326-329, 1995

<sup>337</sup> Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi CT, Odermatt B, Malissen B, Zinkernagel RM, Hengartner H. Ablation of 'tolerance' and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 65:305-317, 1991

- 
- <sup>338</sup> Oldstone MB, Nerenberg M, Southern P, Price J, Lewicki H. Virus infection triggers insulin-dependent diabetes in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell* 65:319-331, 1991
- <sup>339</sup> Ludewig B, Zinkernagel RM, Hengartner H. Transgenic animal models for virus-induced autoimmune diseases. *Exp Physiol* 85:653-659, 2000
- <sup>340</sup> Christen U, Von Herrath MG. Transgenic animal models for type 1 diabetes: linking a tetracycline-inducible promoter with a virus-inducible mouse model. *Transgenic Research* 11:587-595, 2002
- <sup>341</sup> von Herrath MG, Dockter J, Oldstone MB. How virus induces a rapid or slow onset insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell* 65:319-331, 1991
- <sup>342</sup> Wicker LS, Leiter EH, Todd JA, Renjilian RJ, Peterson E, Fischer PA, Podolin PL, Zijlstra M, Jaenisch R, Peterson LB. Beta-2-microglobulin-deficient NOD mice do not develop insulinitis or diabetes. *Diabetes* 43:500-504, 1994
- <sup>343</sup> Mora C, Wong SF, Chang CH, Flavell RA. Pancreatic infiltration but not diabetes occurs in the relative absence of MHC class II-restricted CD4 T cells: studies using NOD/CIITA-deficient mice. *J Immunol* 162:4576-4588, 1999
- <sup>344</sup> Wang B, Gonzalez A, Hoggund P, Katz JD, Benoist C, Mathis D. Interleukin-4 deficiency does not exacerbate disease in NOD mice. *Diabetes* 47:1207-1211, 2001
- <sup>345</sup> Balasa B, Van Gunst K, Jung N, Katz JD, Sarvetnick N. IL-10 deficiency does not inhibit insulinitis and accelerates cyclophosphamide-induced diabetes in the nonobese diabetic mouse. *Cell Immunol* 202:97-102, 2000

- 
- <sup>346</sup> Hultgren B, Huang X, Dybdal N, Stewart TA. Genetic absence of gamma-interferon delays but does not prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes* 45:812-817, 1996
- <sup>347</sup> Trembleau S, Penna G, Gregori S, Chapman HD, Serreze DV, Magram J, Adorini L. Pancreas-infiltrating Th1 cells and diabetes develop in IL-12-deficient nonobese diabetic mice. *J Immunol* 163:2960-2968, 1999
- <sup>348</sup> Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, Babaya N, Liu E, Miao D, Yu L, Wegmann DR, Hutton JC, Elliott JF, Eisenbarth GS. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 435:220-223, 2005
- <sup>349</sup> Yoon JW, Yoon CS, Lim HW, Huang QQ, Kang Y, Pyun KH, Hirasawa K, Sherwin RS, Jun HS. Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in beta cells. *Science* 284:1183-1187, 1999
- <sup>350</sup> Yamamoto T, Yamato E, Tashiro F, Sato T, Noso S, Ikegami H, Tamura S, Yanagawa Y, Miyazaki JI. Development of autoimmune diabetes in glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65) knockout NOD mice. *Diabetologia* 47:221-4, 2004
- <sup>351</sup> Moriyama H, Abiru N, Paronen J, Sikora K, Liu E, Miao D, Devendra D, Beilke J, Gianani R, Gill RG, Eisenbarth GS. Evidence for a primary islet autoantigen (preproinsulin 1) for insulinitis and diabetes in the NOD mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10376-10381, 2003
- <sup>352</sup> Thebault-Baumont K, Dubois-Laforgue D, Krief P, Briand JP, Halbout P, Vallon-Geoffroy K, Morin J, Laloux V, Lehuen A, Carel JC, Jami J, Muller S, Boitard C. Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice. *J Clin Invest* 111:851-857, 2003

- 
- <sup>353</sup> Saeki K, Zhu M, Kubosaki A, Xie J, Lan MS, Notkins AL. Targeted disruption of the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 results in alterations in glucose tolerance tests and insulin secretion. *Diabetes* 51:1842-50, 2002
- <sup>354</sup> 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* 12:431-440, 2000
- <sup>355</sup> Prochazka M, Serreze DV, Frankel WN, Leiter EH. NOR/Lt mice: MHC-matched diabetes-resistant control strain for NOD mice. *Diabetes* 41:98-106, 1992
- <sup>356</sup> Leiter EH. The NOD mouse: a model for analyzing the interplay between heredity and environment in development of autoimmune disease. *ILAR Journal* 35, 1993
- <sup>357</sup> Todd JA, Aitman TJ, Cornall RJ, Ghosh S, Hall JRS, Hearne CM, Knight AM, Love JM, McAleer MA, Prins JB, Rodrigues N, Lathrop M, Pressey A, DeLarato NH, Peterson, Wicker LS. Genetic analysis of autoimmune type 1 diabetes mellitus in mice. *Nature* 351:542-47, 1991
- <sup>358</sup> Custer RP, Bosma GC, Bosma MJ. Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse: pathology, reconstitution, neoplasm. *Am J Pathol* 120:464-477, 1985
- <sup>359</sup> Schuler W, Weiler I, Schuler A, Phillips R, Rosenberg N, Mak T, Kearney J, Perry R, Bosma MJ. Rearrangement of antigen receptor genes is defective in mice with severe combined immune deficiency. *Cell* 46:963-972, 1986
- <sup>360</sup> Fulop GM, Phillips RA. The SCID mutation in mice causes a general defect in DNA repair. *Nature* 347:479-482, 1990

- 
- <sup>361</sup> Kirchgessner CU, Patil CK, Evans JW, Cuomo CA, Fried LM, Carter T, Oettinger MA, Brown JM. DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. *Science* 267:1178-1183, 1995
- <sup>362</sup> Prochazka M, Gaskins HR, Shultz LD, Leiter EH. The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3290-3294, 1992
- <sup>363</sup> Leiter EH, von Herat M. Animal models have little to teach us about Type 1 diabetes: 2. In opposition to this proposal. *Diabetologia* 47:1657-1660, 2004
- <sup>364</sup> Polychronakos C. Animal models of spontaneous autoimmune diabetes: note on their relevance to the human disease. *Current Science* 4:151-154, 2004
- <sup>365</sup> Mestas J, Hughes CCW. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172:2731-2738, 2004
- <sup>366</sup> Roep BO, Atkinson M, von Herrath M. Satisfaction (not) guaranteed: re-evaluating the use of animal models of type 1 diabetes *Nature Reviews Immunology* 4:989-997, 2004
- <sup>367</sup> Hooks JJ, Moutsopoulos HM, Geis SA, Stahl NI, Decker JL, Notkins AL. Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *N Engl J Med* 301:5-8, 1979
- <sup>368</sup> Vives M, Soldevila G, Alcalde L, Lorenzo C, Somoza N, Pujol-Borrell R. Adhesion molecules in human islet beta-cells. De novo induction of ICAM-1 but not LFA-3. *Diabetes* 40:1382-90, 1991
- <sup>369</sup> Guerci AP, Guerci B, Levy-Marchal C, Ongagna J, Ziegler O, Candiloros H, Guerci O, Drouin P. Onset of insulin dependent diabetes mellitus after interferon alpha therapy for hairy cell leukemia. *Lancet* 343:1167-1168, 1994



- 
- <sup>370</sup> Waguri M, Hanafusa T, Itoh N, Imagawa J, Kawata S, Kono N, Kuwajima M, Matsuzawa Y. Occurrence of IDDM during interferon therapy for chronic viral hepatitis. *Diabetes Res Clin Pract* 23:33-36, 1994
- <sup>371</sup> Kado S, Miyamoto J, Komatsu N, Iwaki Y, Ozaki H, Taguchi H, Kure M, Sarashina G, Watanabe T, Katsura Y, Nemoto Y, Noritake M, Matsuoka T. Type 1 diabetes mellitus caused by treatment with interferon-beta. *Int Med* 39:146-149, 2000
- <sup>372</sup> Huang X, Hultgren B, Dybdal N, Stewart TA. Islet expression of interferon-alpha precedes diabetes in both the BB rat and streptozotocin-treated mice. *Immunity* 1:469-478, 1994
- <sup>373</sup> Benavides F, Glasscock E, Coghlan LG, Stern MC, Weiss DA, Conti CJ. PCR-based microsatellite analysis for differentiation and genetic monitoring of nine inbred SENCAR mouse strains. *Lab Anim* 35:157-162, 2001
- <sup>374</sup> Serreze DV, Fleming SA, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch RM. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 161:3912, 1998
- <sup>375</sup> Montanya E, Nacher V, Biarnes M, Soler J. Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy. *Diabetes* 49:1341-1346, 2000
- <sup>376</sup> Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25:402-408, 2001
- <sup>377</sup> Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47:187-376, 1989

- 
- <sup>378</sup> Habu S, Fukui H, Shimamura K, Kasai M, Nagai Y, Okumura K, Tamaoki N. In vivo effects of anti-asialo GM1. I. Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. *J Immunol* 127:34-38, 1981
- <sup>379</sup> Lee IF, Qin H, Trudeau J, Dutz J, Tan R. Regulation of autoimmune diabetes by complete Freund's adjuvant is mediated by NK cells. *J Immunol* 172:937-42, 2004
- <sup>380</sup> Jansen A, Rosmalen JG, Homo-Delarche F, Dardenne M and Drexhage HA. Effect of prophylactic insulin treatment on the number of ER-MP23+ macrophages in the pancreas of NOD mice: is the prevention of diabetes based on beta-cell rest? *J Autoimmun* 9:341-348, 1996
- <sup>381</sup> Deltour L, Leduque P, Blume N, Madsen O, Dubois P, Jami J, Bucchini D. Differential expression of the two non-allelic proinsulin genes in the developing mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:527-531, 1993
- <sup>382</sup> Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, Wagner J, Wu J, Phillips JH, Lanier LL. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 12:721-727, 2000
- <sup>383</sup> Malarkannan S, Shih PP, Eden PA, Horng T, Zuberi AR, Christianson G, Roopenian D, Shastri N. The molecular and functional characterization of a dominant minor H antigen, H60. *J Immunol* 161:3501-3509, 1998
- <sup>384</sup> Diefenbach A, Hsia JK, Hsiung MY, Raulet DH. A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity. *Eur J Immunol* 33:381-391, 2003
- <sup>385</sup> Alba A, Planas R, Verdaguer J, Vives-Pi M. Viral infections and autoimmune diabetes. *Inmunología* 24:33-43, 2005

- 
- <sup>386</sup> Christen U, Benke D, Wolfe T, Rodrigo E, Rhode A, Hughes AC, Oldstone MBA, von Herrath MG. Cure of prediabetic mice by viral infections involves lymphocyte recruitment along an IP-10 gradient. *J Clin Invest* 113:74, 2004
- <sup>387</sup> Hänninen A, Hamilton-Williams E, Kurts C. Development of new strategies to prevent type 1 diabetes: the role of animal models. *Ann Med* 35:546, 2003
- <sup>388</sup> Iwagura Y, Asano M, Mishimune Y and Kawade I. Male sterility of transgenic mice carrying exogenous mouse interferon-beta under the control of metallothionein enhancer-promoter. *EMBO J* 7:3757-3762, 1988
- <sup>389</sup> Lühder F, Hoglund P, Allison J.P, Benoist C, and Mathis D. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. *J Exp Med* 187:427-432, 1998
- <sup>390</sup> Trudeau JD, Dutz JP, Arany E, Hill DJ, Fieldus WE, Finegood DT. Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? *Diabetes* 49:1-7, 2000
- <sup>391</sup> Ablamunits, V., D. Elias, and I. R. Cohen. The pathogenicity of islet infiltrating lymphocytes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Clin Exp Immunol* 115:260, 1999
- <sup>392</sup> Roche, E. F., H. Lewy, H. M. Hoey, and Z. Laron. Differences between males and females in the seasonality of birth and month of clinical onset of disease in children with type 1 diabetes mellitus in Ireland. *J Pediatr Endocrinol Metab* 16:779, 2003
- <sup>393</sup> Amrani A, Jafarian-Tehrani M, Mormede P, Durant S, Pleau JM, Haour F, Dardenne M, Homo-Delarche F. Interleukin-1 (IL-1) effect on glycaemia in the nonobese diabetic (NOD) mouse at the prediabetic stage. *J Endocrinol* 148:139-148, 1996

- 
- <sup>394</sup> Faure A, Sutter-Dub MT, Sutter BCJ, Assan R. Ovarian-adrenal interactions in regulation of endocrine pancreatic function in the rat. *Diabetologia* 24:122-127, 1983
- <sup>395</sup> Finegood D, Scaglia L, Bonner-Weir S. Dynamics of beta cell mass in the growing rat pancreas: estimation with a simple mathematical model. *Diabetes* 44:249-256, 1995
- <sup>396</sup> Jansen A, Rosmalen JG, Homo-Delarche F, Dardenne M and Drexhage HA. Effect of prophylactic insulin treatment on the number of ER-MP23+ macrophages in the pancreas of NOD mice: is the prevention of diabetes based on beta-cell rest? *J Autoimmun* 9:341-348, 1996
- <sup>397</sup> Rosmalen JG, Homo-Delarche F, Durant S, Kap M, Leenen PJ and Drexhage HA. Islet abnormalities associated with an early influx of dendritic cells and macrophages in NOD and NODscid mice. *Lab Invest* 80:769-77, 2000
- <sup>398</sup> Wicker LS, Todd JA, Prins JB, Podolinm PL, Renjilian RJ, Peterson LB. Resistance alleles at two non-major histocompatibility complex-linked insulin-dependent diabetes loci on chromosome 3, Idd3 and Idd10, protect nonobese diabetic mice from diabetes. *J Exp Med* 180:1705-1713, 1994
- <sup>399</sup> Pilling D, Akbar A.N, Girdlestone J, Orteu C.H, Borthwick N.J, Amft N, Scheel-Toellner D, Buckley C.D and Salmon M. Interferon-beta mediates stromal cell rescue of T cells from apoptosis. *Eur J Immunol* 29:1041-1050, 1999
- <sup>400</sup> Tough D.F, Borrow P. and Sprent J. Induction of bystander T-cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science* 272:1947-1950, 1996
- <sup>401</sup> Zang YC, Skinner SM, Robinson RR, Rivera VM, Hutton GJ, Zhang JZ. Regulation of differentiation and functional properties of monocytes and

---

monocyte-derived dendritic cells by interferon beta in multiple sclerosis. *Mult Scler* 10:499-506, 2004

<sup>402</sup> Azuma A, Li YJ, Abe S, Usuki J, Matsuda K, Henmi S, Miyauchi Y, Ueda K, Izawa A, SOne S, Hashimoto S, Kudoh S. Interferon-beta inhibits bleomycin-induced lung fibrosis by decreasing transforming growth factor-beta and thrombospondin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32:93-98, 2005

<sup>403</sup> Hamilton-Williams EE, Palmer SE, Charlton B, Slattery RM. Beta cell MHC class I is a late requirement for diabetes. *Proc Nat Acad Sci USA* 100:6688–6693, 2003

<sup>404</sup> Herberts CA, van Gaans-van den Brink J, van der Heeft E, van Wijk M, Hoekman J, Jaye A, Poelen MC, Boog CJ, Roholl PJ, Whittle H, et al. Autoreactivity against induced or upregulated abundant self-peptides in HLA-A\*0201 following measles virus infection. *Hum Immunol* 64:44, 2003

<sup>405</sup> McInerney MF, Rath, Janeway CA. Exclusive expression of MHC class II proteins on CD45+ cells in pancreatic islets of NOD mice. *Diabetes* 40:648-651, 1991

<sup>406</sup> Tian J, Zekzer D, Hanssen L, Lu Y, Olcott A, Kaufman DL. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 67:1081-9, 2001

<sup>407</sup> Johansson S, Berg L, Hall H, Höglund P. NK cells: elusive players in autoimmunity. *Trends Immunol*. Article in press, proofs corrected, 2005

<sup>408</sup> Zhang B, Yamamura T, Kondo T, Fujiwara M, Tabira T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J Exp Med* 186:1677-1687, 1997

- 
- <sup>409</sup> Shi FD, Wang HB, Li H, Hong S, Taniguchi M, Link H, Van Kaer L, Ljunggren HG. Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. *Nat Immunol* 1:245-251, 2000
- <sup>410</sup> Loza MJ, Zamai L, Azzoni L, Rosati E, Perussia B. Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells. *Blood* 99:1273-81, 2002
- <sup>411</sup> Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23:225-374, 2005
- <sup>412</sup> Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 413:165-171, 2001
- <sup>413</sup> Ogasawara K,<sup>1</sup> Hamerman JA, Ehrlich LR, Bour-Jordan H, Santamaria P, Bluestone JA, Lewis L. Lanier. NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity* 20:757-767, 2004
- <sup>414</sup> Leonidas N, Carayannopoulos LN, Naidenko OV, Fremont DH, Yokoyama WM. Murine UL16-binding protein-Like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol* 169:4079-4093, 2002
- <sup>415</sup> Colucci F, Di Santo JP, Leibson PJ. Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? *Nat Immunol* 3:807-13, 2002
- <sup>416</sup> Pilstrom B, Bjork L, Bohme J. Demonstration of a Th1 cytokine profile in the late phase of NOD insulinitis. *Cytokine* 7:806-814, 1995
- <sup>417</sup> Vankayalapati R, Klucar P, Wizel B, Weis S E, Samten B, Safi H, Shams H, Barnes P F. NK cells regulate CD8<sup>+</sup> T cell effector function in response to an intracellular pathogen. *J Immunol* 172:130-137, 2004

- 
- <sup>418</sup> Mailliard R B, Son Y I, Redlinger R, Coates P T, Giermasz A, Morel P A, Storkus W J, Kalinski P. Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: Two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J Immunol* 171:2366–2373, 2003
- <sup>419</sup> Anderson JT, Cornelius JG, Jarpe AJ, Winter WE, Peck AB. Insulin-dependent diabetes in the NOD mouse model. II. Beta cell destruction in autoimmune diabetes is a Th2 and not a Th1 mediated event. *Autoimmunity* 15:113-122, 1993
- <sup>420</sup> Kolb H, Wörz-Pagenstert U, Kleemann R, Rothe H, Rowsell P, Scott FW. Cytokine gene expression in the BB rat pancreas: Natural course and impact of bacterial vaccines. *Diabetologia* 39:1448-1454, 1996
- <sup>421</sup> Zipris D, Greiner DL, Malkani S, Whalen B, Mordes JP, Rossini AA. Cytokine gene expression in islets and thyroids of BB rats. *J Immunol* 156:1315-1321, 1996
- <sup>422</sup> Rabinovich A, Suarez-Pinzon W, El-Sheikh A, Sorensen O, Power RF. Cytokine gene expression in pancreatic islet-infiltrating leukocytes of BB rats: expression of Th1 cytokines correlates with beta-cell destructive insulinitis and IDDM. *Diabetes* 45:749-754, 1996
- <sup>423</sup> Sobel DO, Newsome J, Ewel CH, Bellanti JA, Abbassi V, Creswell K, Blair O. Poly I:C induces development of diabetes mellitus in BB rat. *Diabetes* 41:515-520, 1992
- <sup>424</sup> Lepault F, Gagnerault MC. L-selectin<sup>-/-</sup> and diabetogenic T cells are similarly distributed in prediabetic and diabetic NOD mice. *Lab Invest* 78:551-558, 1998

- 
- <sup>425</sup> Yang Y, Bao M, Yoon JW. Intrinsic Defects in the T-Cell Lineage Results in Natural Killer T-Cell Deficiency and the Development of Diabetes in the Nonobese Diabetic Mouse. *Diabetes* 50:2691-2699, 2001
- <sup>426</sup> Poulton LD, Smyth MJ, Hawke CG, Silveira P, Shepherd D, Naidenko OV, Godfrey DI, Baxter AG. Cytometric and functional analyses of NK and NKT cell deficiencies in NOD mice. *Int Immunol* 13:887-96, 2001
- <sup>427</sup> Gagnerault MC, Luan JJ, Lotton C, Lepault F. Pancreatic lymph nodes are required for priming of beta cell reactive T cells in NOD mice. *J Exp Med* 196:369-377, 2002
- <sup>428</sup> Iwakoshi NN, Greiner DL, Rossini AA, Mordes JP. Diabetes prone BB rats are severely deficient in natural killer T cells. *Autoimmunity* 31:1-14, 1999
- <sup>429</sup> Wilson SB, et al. Multiple differences in gene expression in regulatory Valpha 24Jalpha Q T cells from identical twins discordant for type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:7411-7416, 2000
- <sup>430</sup> Hammond KJL, Poulton LD, Palmisano, LJ, Silveira PA, Godfrey DI, Baxter AG. Alpha/beta-T cell receptor TCR<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (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* 187:1047, 1998
- <sup>431</sup> Chatenoud L, Primo J, Bach JF. CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice. *J Immunol* 158:2947-54, 1997
- <sup>432</sup> Matzinger P: Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991-1045, 2000
- <sup>433</sup> Galluci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13.114-119, 2001



- 
- <sup>434</sup> Siren J, Pirhonen J, Julkunen I, Matikainen S. IFN-alpha regulates TLR-dependent expression of IFN-alpha, IFN-beta, IL-28, and IL-29. *J Immunol* 174:1932-7, 2005
- <sup>435</sup> Wen L, Peng J, Li Z, Wong FS. The effect of innate immunity on autoimmune diabetes and the expression of toll-like receptors on pancreatic islets. *J Immunol* 1725:3173-3180, 2004
- <sup>436</sup> Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptative immunity. *Nat Immunol* 5:971-974, 2004
- <sup>437</sup> Beg AA. Endogenous ligands of toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trend Immunol* 23:509-512, 2002
- <sup>438</sup> Akira S. Mammalian toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 15:5-11, 2003
- <sup>439</sup> Lang KS, Recher M, Junt T, Navarini AA, Harris NL, Freigang S, Odermatt B, Conrad C, Ittner LM, Bauer S, Luther SA, Uematsu S, Akira S, Hengartner H, Zinkernagel RM. Toll-like receptor engagement convert T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nat Med* 11:138-145, 2005
- <sup>440</sup> Akira S, Takeda K and Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2:675-680, 2001
- <sup>441</sup> Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216, 2002
- <sup>442</sup> Miettinen M, Sareneva T, Julkunen I, Matikainen S. IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes and Immunity* 6:349-355, 2001
- <sup>443</sup> Toll-like receptor 3 mediates a more potent antiviral response than toll-like receptor 4. *J Immunol* 170:3565-71, 2003

<sup>444</sup> Matzinger Polly. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296:301-305, 2002